

Einfluss der Zellaufschlussmethode auf die Expanded Bed Chromatographie

Von der Fakultät für Maschinenbau
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig

zur Erlangung der Würde

eines Doktor-Ingenieurs (Dr.-Ing.) genehmigte

Dissertation

von

Dipl.-Biotechnol. Ingo Kampen
aus Hildesheim

eingereicht am: 21. Juni 2005

mündliche Prüfung am: 17. November 2005

Referenten: Prof. Dr.-Ing. J. Schwedes
Prof. Dr. rer. nat. W.-D. Deckwer

Prüfungsvorsitzender: Prof. Dr.-Ing. M. Bohnet

2005

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand während meiner Tätigkeit als wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Mechanische Verfahrenstechnik der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig bei der Bearbeitung des Teilprojekts C1 im Sonderforschungsbereich 578 "Integration gen- und verfahrenstechnischer Methoden zur Entwicklung biotechnologischer Prozesse - Vom Gen zum Produkt -".

Als ich im November 2001 meine Zeit als wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Mechanische Verfahrenstechnik begann, wusste ich noch nicht, welche hervorragende Wahl ich da traf. Herr Prof. Dr.-Ing. J. Schwedes, der Leiter des Instituts, stand stets hinter mir und stärkte mir den Rücken. Gleichzeitig ließ er mir auch große Freiheiten, so dass ich meinen eigenen Weg finden konnte, um das Forschungsprojekt zu bearbeiten. Dafür gilt ihm mein besonderer Dank.

Auch bei Herrn Prof. Dr. rer. nat. W.-D. Deckwer möchte ich mich herzlich für die gute Zusammenarbeit und die Übernahme des Koreferats bedanken.

Bei Herrn Prof. Dr.-Ing. M. Bohnet bedanke ich mich für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Hauptverantwortlich dafür, dass mir die Arbeit stets viel Freude bereitet hat, waren aber meine (ehemaligen) Kollegen im Biozentrum. Bei Georg Strünkmann, Marc Ergezinger, Sonja Berensmeier, Veronika Vaszary, Johannes Müller und Stephanie Michel möchte ich mich besonders für die zahlreichen fachlichen, aber auch privaten Gespräche und Ratschläge bedanken.

Für die Anfertigung von Studien- und Diplomarbeiten, die auch maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, möchte ich mich bei Anika Nolte, Irena Völkerding, Said Nahle, Barbara Tyralla und Hajo Reershemius bedanken. Ferner bedanke ich mich bei Tim Herrmann und Sven Götze, die ihre Diplomarbeiten im gleichen Forschungsprojekt, aber an anderen Instituten durchgeführt haben. Auch ihre Ergebnisse flossen in diese Arbeit mit ein.

Für die gute Zusammenarbeit bei zahlreichen, spannenden Fermentationen danke ich Rajan Hollmann, Hartmut Schüler und Wolfgang Graßl.

Für die Zusammenarbeit zur Herstellung elektronenmikroskopischer Aufnahmen bedanke ich mich bei Prof. Dr. M. Schilling und Kerstin Franke.

Meiner Tochter Cassandra danke ich für die viele Freude, die sie mir bereitet.

1	Einleitung	1
2	Theoretische Grundlagen	2
2.1	Der Zellaufschluss	2
2.1.1	Mikroorganismen - Aufbau und Morphologie	3
2.1.1.1	Zellwandaufbau Gram positiver und Gram negativer Bakterien	4
2.1.1.2	Zellwandaufbau von Hefe	6
2.1.2	Messung des Zellaufschlusserfolgs	6
2.1.3	Chemische Methoden des Zellaufschlusses	7
2.1.3.1	Antibiotika	7
2.1.3.2	Chelatbildner	7
2.1.3.3	Chaotrope Agenzien	7
2.1.3.4	Detergenzien	8
2.1.3.5	Alkalische Behandlung	8
2.1.4	Biologische Methoden des Zellaufschlusses	8
2.1.4.1	Enzymatischer Zellaufschluss	8
2.1.4.2	Phagen	8
2.1.4.3	Autolyse	9
2.1.5	Physikalische Methoden	9
2.1.5.1	Thermolyse	9
2.1.5.2	Einfrieren/Auftauen	9
2.1.5.3	Dekompression	9
2.1.6	Mechanische Methoden des Zellaufschlusses	10
2.1.6.1	Beanspruchungsarten des mechanischen Zellaufschlusses	10
2.1.6.2	Mechanische Eigenschaften von Mikroorganismen	13
2.1.6.3	Zellaufschluss mittels Hochdruckhomogenisator	14
2.1.6.4	Zellaufschluss mittels Rührwerkskugelmöhlen	18
2.1.6.5	Zellaufschluss mittels Ultraschallhomogenisator	23
2.1.6.6	Weitere Geräte für den mechanischen Zellaufschluss	25
2.2	Die Expanded Bed Chromatographie	27
2.2.1	Adsorbermaterial	28
2.2.2	Expansionsverhalten	30
2.2.3	Verweilzeitverteilung	31
2.2.3.1	Einfluss von Zelltrümmern auf die Verweilzeitverteilung	34
2.2.4	Adsorption	35
2.2.4.1	Das Zeta-Potential	37
2.2.4.2	Modelle zur Beschreibung der Proteinadsorption	39
2.2.4.3	Einflussfaktoren auf die Adsorption	41
2.2.5	Strömungsverteiler	44
2.2.6	Modellierung der Expanded Bed Chromatographie	44
2.3	Dextranucrase	46
3	Material und Methoden	48
3.1	Methoden der Kultivierung	48
3.1.1	Kultivierung von <i>Escherichia coli</i>	49
3.1.2	Kultivierung von <i>Bacillus megaterium</i>	50
3.1.3	Biotrockenmassebestimmung	53
3.2	Methoden zur Untersuchung des Zellaufschlusses	53
3.2.1	Eingesetzte Zellaufschlussgeräte	53
3.2.1.1	Die Rührwerkskugelmühle	53
3.2.1.2	Der Hochdruckhomogenisator	53
3.2.1.3	Der Ultraschallhomogenisator	54
3.2.2	Bestimmung der Proteinkonzentration (Bradford)	54
3.2.3	Rasterelektronenmikroskopieaufnahmen	55

Inhaltsverzeichnis

3.2.4	Dextransucraseaktivitätstest	56
3.2.5	Messung des Zeta-Potentials.....	57
3.2.6	Partikelgrößenverteilung	57
3.2.7	Viskositätsmessung	57
3.3	Methoden zur Aufnahme von Adsorptionsisothermen	57
3.3.1	Messung der Adsorptionsisothermen.....	58
3.3.2	Handhabung des Adsorbermaterials.....	58
3.3.3	Verwendete Proteine.....	58
3.4	Methoden der Expanded Bed Untersuchungen	61
3.4.1	Aufbau der Expanded Bed Anlage	61
3.4.2	Programm zur Messwerterfassung und Regelung der Anlage	62
3.4.3	Durchführung der Verweilzeitmessungen	64
3.4.3.1	Tracerauswahl.....	65
3.4.3.2	Berechnung der Bodensteinzahl.....	66
3.4.3.3	Reinigungsverfahren (CIP-Prozedur).....	68
4	Ergebnisse und Diskussion	69
4.1	Untersuchung des Zellaufschlusses.....	69
4.1.1	Zellaufschluss von <i>B. megaterium</i> in der Rührwerkskugelmühle	69
4.1.2	Zellaufschluss von <i>B. megaterium</i> im Hochdruckhomogenisator	70
4.1.3	Zellaufschluss von <i>B. megaterium</i> im Ultraschallhomogenisator	73
4.1.4	Zellaufschluss von <i>E. coli</i> in der Rührwerkskugelmühle.....	75
4.1.5	Zellaufschluss von <i>E. coli</i> im Hochdruckhomogenisator	76
4.1.6	Zellaufschluss von <i>E. coli</i> mit Hilfe des Ultraschallhomogenisators	78
4.1.7	Vergleich des Zellaufschlusses von <i>B. megaterium</i> und <i>E. coli</i>	79
4.2	Einflussparameter auf die Adsorption	80
4.2.1	Abhängigkeit der Adsorption vom Puffersystem.....	80
4.2.2	Adsorption an Expanded Bed Adsorberpartikeln.....	82
4.2.3	Zusammenfassung des Kapitels Adsorption	84
4.3	Fluiddynamik im Expanded Bed	85
4.3.1	Expansionsverhalten	85
4.3.2	Partikelgrößenverteilung entlang der Säule	86
4.3.3	Verweilzeit ohne Zelltrümmer.....	88
4.4	Einfluss von Zelltrümmern auf die Verweilzeitverteilung im Expanded Bed	89
4.4.1	Die Viskositätsänderung als Grund für die veränderte Verweilzeitverteilung.....	91
4.4.2	Veränderung der Verweilzeitverteilung durch Agglomeration	92
4.4.2.1	Veränderung des Zeta-Potentials durch den Zellaufschluss	92
4.4.2.2	Einfluss der Partikelgeometrie auf die Agglomeration	93
4.5	Abschließende Diskussion.....	95
5	Zusammenfassung	96
6	Literaturverzeichnis	98
7	Anhang.....	105

Symbolverzeichnis

Lateinische Formelzeichen

a	[-]	Konstante
A	[%]	Aufschlussgrad
BE	[Nm]	Beanspruchungsenergie
BZ	[-]	Beanspruchungszahl
c	[kg/m ³]	Konzentration
C	[-]	auf Ausgangskonzentration bezogene Konzentration
c*	[g/l]	Gleichgewichtskonzentration in der Flüssigphase
c ₀	[kg/m ³]	Startkonzentration
c _{BTM}	[kg/m ³]	Biotrockenmassekonzentration
c _{max}	[kg/m ³]	maximale Konzentration
d	[m]	Durchmesser
d _c	[m]	Säulendurchmesser
d _{MK}	[m]	Mahlkörperdurchmesser
d _p	[m]	Partikeldurchmesser
D _{ax,l}	[m ² /s]	axialer Diffusionskoeffizient
D _h	[m ² /s]	homogener Diffusionskoeffizient
D _p	[m ² /s]	Porendiffusionskoeffizient
E _{spez}	[J/kg]	spezifische Energie
E _{lMG}	[Pa]	Elastizitätsmodul des Mahlguts
E _{lMK}	[Pa]	Elastizitätsmodul der Mahlkörper
F	[m ³ /s]	Zufütterungsrate
g	[m/s ²]	Erdbeschleunigung: 9,81 m/s ²
h	[m]	Höhe
j	[-]	Anzahl
J	[kg/s]	Stoffstrom
k	[-]	Konstante
K _d	[m ³ /kg]	Konstante
K _M	[mmol/l]	Michaelis-Menten Konstante
l	[m]	Länge
L	[-]	dimensionslose Länge
M	[Nm]	Drehmoment
M ₀	[Nm]	Drehmoment ohne Mahlkörper und Suspension
n	[-]	Koeffizient
N	[-]	Anzahl Homogenisierschritte
p	[Pa]	Druck
P	[J/s]	Leistung
q*	[g/l]	Gleichgewichtsbeladung der stationären Phase
q _m	[g/l]	maximale Beladung der stationären Phase
r _{RS}	[m]	Radius der Rührscheiben
S	[-]	effektive Zellstabilität

Symbolverzeichnis

S_F	[kg/m ³]	Substratkonzentration im Feed
t	[s]	Zeit
u_0	[m/s]	Leerrohrgeschwindigkeit
u_{ss}	[m/s]	Schwarmsinkgeschwindigkeit
u_t	[m/s]	terminale Sinkgeschwindigkeit
V	[m ³]	Volumen
\dot{V}	[m ³ /s]	Volumenstrom
V_0	[m ³]	Startvolumen
$V_{akt, MK}$	[m ³]	zerkleinerungsaktives Volumen zwischen zwei Mahlkörpern
V_c	[m ³]	Volumen des freien Fluids in der Säule (ohne Partikelvolumen)
V_{Susp}	[m ³]	Suspensionsvolumen
v_t	[m/s]	Rührscheibenumfangsgeschwindigkeit
w	[m/s]	Fließgeschwindigkeit
x_P	[m]	Größe der Mahlgutpartikel
X_0	[kg/m ³]	Biomassekonzentration zum Zeitpunkt Null
$Y_{X/S}$	[-]	Ausbeutekoeffizient kg Biomasse pro kg Substrat
z_2	[-]	Anzahl elektrischer Ladungen

Kennzahlen

Re	[-]	Reynoldszahl
Re_t	[-]	Reynoldszahl bei terminaler Sinkgeschwindigkeit eines Partikels
We	[-]	Weberzahl
Bo	[-]	Bodensteinzahl

Symbolverzeichnis

Griechische Formelzeichen

δ	[m]	Filmdicke
Δp	[Pa]	Druckdifferenz
ε	[-]	Hohlraumanteil
ε_0	[-]	Hohlraumanteil des sedimentierten Betts
ε_{kp}	[-]	Hohlraumanteil der kubisch primitiven Packung
η	[Pas]	dynamische Viskosität
Θ	[-]	reduzierte Verweilzeit
ν	[1/s]	Drehfrequenz
ξ	[-]	Strömungswiderstandsbeiwert
κ	[mS/cm]	Leitfähigkeit
λ	[-]	Hinderungsfaktor
Λ	[g/l]	Gesamtkapazität für ein monovalentes Gegenion
μ	[-]	Wachstumsrate
ρ	[kg/m ³]	Dichte
ρ_l	[kg/m ³]	Fluiddichte
ρ_{MK}	[kg/m ³]	Mahlkörperdichte
ρ_P	[kg/m ³]	Partikeldichte
σ	[J/m ² = N/m]	Oberflächenspannung
σ_2	[-]	Anzahl abgeschirmter Bindungsstellen
σ^2		Varianz
τ	[m ³ /(m ³ /s)]	mittlere Verweilzeit
τ_P	[-]	Labyrinthfaktor
φ_{MK}	[-]	Mahlkörperfüllgrad
ω	[1/s]	Winkelgeschwindigkeit

Symbolverzeichnis

Abkürzungen

ABTS	2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonsäure)diammoniumsalz
Bis-Tris	bis(2-Hydroxymethyl)amino-tris(hydroxymethyl)methan
Bis-Tris-Propan	1,3-bis[tris-(Hydroxymethyl)methylamino]propan
BSA	Rinderserumalbumin (Bovine Serum Albumine)
BTM	Biotrockenmasse
CAT	Katalase
CIP	Cleaning in Place (Reinigungsprozedur)
CTI	Cell Transmission Index
DEAE	Diethylaminoethyl (schwacher Anionenaustauscher)
DLVO	Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek (Theorie)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
GRAS	Generally Regarded As Safe
GZ	Ganze Zellen
HH	Hochdruckhomogenisator
[HS]	Konzentration nicht dissoziierter Säuremoleküle
HPLC	High Performance Liquid Chromatographie
LYS	Lysozym
MG	Mahlgut
MK	Mahlkörper
MOPS	3-(n-Morpholino)Propansulfonsäure
NaAc	Natriumacetat
OVA	Ovalbumin
PIPES	Piperazin-1,4-bis(2-ethansulfonsäure)
pK _s	Gleichgewichtskonstante der Henderson-Hasselbalch Gleichung
PDE	Plug flow with axial Dispersion and mass Exchange - Modell
POD	Peroxidase
QXL	Quatäres Amin (starker Anionenaustauscher)
RWKM	Rührwerkskugelmühle
[S ⁻]	Anionenkonzentration einer Säure
SDS	Sodiumdodecylsulfate
SMA	Steric Mass Action Modell
SP	Sulfopropyl (starker Kationenaustauscher)
Tris/HCl	Tris(Hydroxymethyl)aminomethan, pH mit Salzsäure eingestellt
USH	Ultraschallhomogenisator

1 Einleitung

Auf dem Weg vom Gen zum Produkt ist das Downstream Processing, welches die Verfahrensschritte nach der Kultivierung zur Reinigung und Formulierung des Produkts beinhaltet, zumeist der aufwändigste und teuerste Schritt. Ein sehr aufwändiger Schritt ist die Abtrennung der Zelltrümmer, die bei der Aufreinigung intrazellulärer Produkte aufgrund des notwendigen Zellaufschlusses zwangsläufig auftreten. Industriell wird die Abtrennung der Zelltrümmer häufig durch Zentrifugation oder Filtration realisiert. Aufgrund der geringen Größe der Zelltrümmer und ihres kleinen Dichteunterschieds zum Medium sind beide Verfahren problematisch. Ein Verfahren, das die Abtrennung der Zelltrümmer mit einem ersten chromatographischen Reinigungsschritt verbindet, ist das Expanded Bed. In diesem wird die Suspension durch ein fluidisiertes Bett aus z.B. Ionenaustauschern gepumpt. Während der Aufenthaltszeit der Suspension zwischen den Partikeln soll das Zielprodukt an die Partikel binden, wohingegen die Zelltrümmer und andere unerwünschte Bestandteile der Suspension die Säule wieder verlassen.

Eine hohe Rückvermischung, Strömungskanäle und Totzonen stören die gleichmäßige Durchströmung der Säule und verringern so die Reinigungsleistung. Zelltrümmer können aber unter bestimmten Umständen genau diese Wirkung auf die Fluidodynamik ausüben. Die genauen Gründe dafür werden in der Literatur noch diskutiert. Auch die Frage, ob die Effizienz der Expanded Bed Chromatographie durch die Nutzung verschiedener Aufschlussgeräte beeinflusst wird, steht noch offen.

Daher wurden im Rahmen des Teilprojekts C1 des Sonderforschungsbereichs 578 "Integration gen- und verfahrenstechnischer Methoden zur Entwicklung biotechnologischer Prozesse - Vom Gen zum Produkt -" der Aufschluss eines Gram positiven (*Bacillus megaterium*) und eines Gram negativen Bakteriums (*Escherichia coli*) untersucht und der Einfluss der verschiedenen Zellaufschlussmethoden auf das Strömungsverhalten im Expanded Bed gemessen.

Diese Arbeit soll zum Verständnis des Zusammenhangs zwischen Zellaufschluss und Expanded Bed Chromatographie beitragen, indem die Grundlagen beider Methoden herausgearbeitet werden und ihr Zusammenspiel in Form der resultierenden Strömungseigenschaften näher beleuchtet wird.

2 Theoretische Grundlagen

Die folgenden theoretischen Grundlagen sollen einen Überblick über den Zellaufschluss, die Adsorption sowie das Expanded Bed geben. Das Kapitel Zellaufschluss behandelt insbesondere die mechanischen Methoden Hochdruckhomogenisator, Ultraschallhomogenisator und Rührwerkskugelmühle, aber auch biologische und chemische Methoden zum Zellaufschluss.

2.1 Der Zellaufschluss

Bei der Reinigung intrazellulärer Wertstoffe müssen diese aus der Zelle in das umgebende, meist wässrige Medium entlassen werden. Diesem steht jedoch die Zellohülle als Diffusionswiderstand entgegen. Insbesondere große, geladene Moleküle bereiten Schwierigkeiten bei der Ausschleusung.

In einigen Fällen reicht es schon, die Zellwand leicht zu schädigen, so dass das Zielprodukt aus dem Cytoplasma oder dem periplasmatischen Raum einfach ins Medium diffundieren kann, in anderen Fällen ist es notwendig, die Zelle mit mechanischen Zellaufschlussmethoden zu öffnen.

Alle Zellaufschlussmethoden unterliegen jedoch bestimmten Anforderungen:

- keine Produktschädigung oder Denaturierung
Insbesondere Proteine neigen zur Denaturierung bei zu hohen Temperaturen. Dabei verändern sie ihre dreidimensionale Struktur derart, dass sie ihre Funktion verlieren. Auch wenn die Erhöhung der Temperatur das Enzym nicht direkt schädigt, so können Proteasen bei erhöhter Temperatur deutlich aktiver werden und so die Funktion des Proteins beeinträchtigen. Auch die Adsorption des Proteins an den Wänden des Zellaufschlussgeräts kann die Aktivität im Medium verringern.
- hoher Aufschlussgrad
- Sterilisierbarkeit der Zellaufschlussapparatur
Da die Produktion biotechnologischer Produkte in der Regel mit genetisch veränderten Organismen durchgeführt wird, müssen die Zellaufschlussgeräte nach Gebrauch sterilisiert werden.
- keine Produktverunreinigungen
Dieser Punkt ist insbesondere bei pharmazeutischen Produkten wichtig. Dort scheiden viele chemische Zellaufschlussverfahren aus, da die Agenzien gesundheitsschädlich sind und nur mit großem Aufwand und Produktverlust wieder entfernt werden können.
- gute Abtrennbarkeit der Zellbruchstücke

- geringer Energieaufwand
Dieser Punkt ist nicht nur aufgrund des Kostenfaktors wichtig, sondern weil nahezu die gesamte eingetragene Energie in Wärme umgewandelt wird.
- geringer Zeitaufwand
- geringe Investitionskosten

Die Zellaufschlussmethoden lassen sich grob in chemische, biologische und physikalische Methoden einteilen. Eine Zusammenstellung gebräuchlicher Methoden findet sich in Abb. 1.

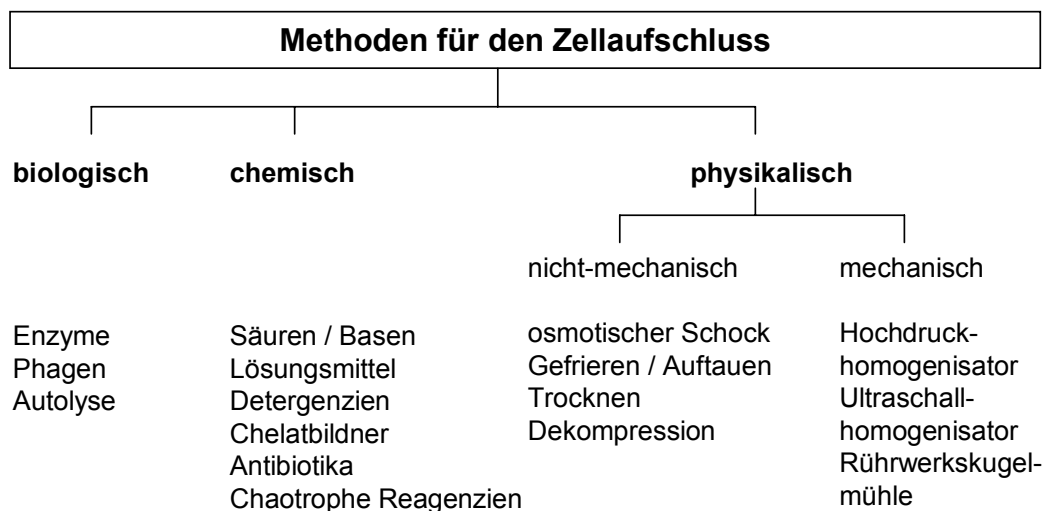


Abb. 1: Zusammenstellung einiger gebräuchlicher Aufschlussmethoden

Die Mehrheit der in Abb. 1 dargestellten Methoden zum Zellaufschluss werden lediglich im Laboratoriumsmaßstab durchgeführt. Im Produktionsmaßstab haben sich neben der Autolyse vor allem die Anwendung des Hochdruckhomogenisators und der Rührwerkskugelmühle bewährt. Ein guter Überblick über die verschiedenen Möglichkeiten zum Zellaufschluss findet sich bei folgenden Veröffentlichungen: [Edebo, 1969; Hughes et al., 1971; Middelberg, 1998].

2.1.1 Mikroorganismen - Aufbau und Morphologie

Zellen, die in der Produktion biotechnologischer Substanzen eingesetzt werden, können sich dramatisch voneinander unterscheiden. Neben einzelligen Bakterien unterschiedlicher Herkunft werden auch Pilze, Säugerzellen und Pflanzenzellen verwandt. Sie unterscheiden sich sowohl in der Größe, im Aufbau, der Stabilität als auch in der Wuchsform. Im Folgenden werden der Aufbau und die Eigenschaften von Bakterien sowie einzelligen Pilzen näher beleuchtet.

Bakterien sind in der Regel zwischen 0,5 µm und 5 µm groß. Die verschiedenen Gattungen können sich in ihrer Morphologie deutlich unterscheiden. Typische Formen sind: Kugeln, Stäbchen, Spiralen oder Kommata. Sie bestehen zu 70-85% aus Wasser. Die Trockenmasse besteht hauptsächlich aus Polymeren: Protein 50%, Zellwand 10-20%, RNA 10-20%, DNA 3-4% und Lipide 10% [Schlegel, 1985].

Theoretische Grundlagen

Bakterien gehören zu den Prokaryonten, die im Vergleich mit Eukaryonten (wie z.B. einer Hefezelle) deutlich einfacher aufgebaut sind. Abb. 2 stellt die wichtigsten Unterschiede noch einmal schematisch dar.

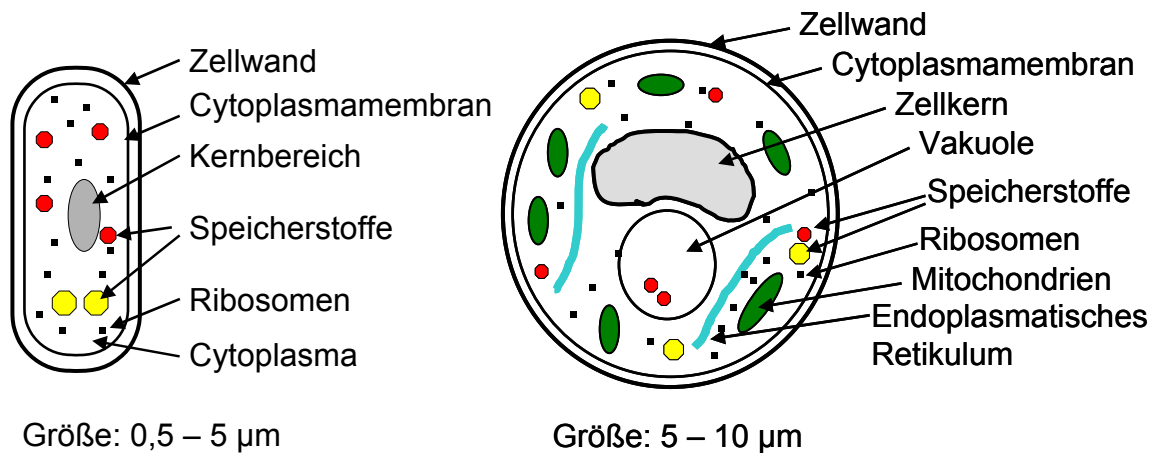


Abb. 2: Schematischer Aufbau von Mikroorganismen; links: Bakterienzelle; rechts: Hefezelle

Das Cytoplasma ist keine homogene Proteinlösung, sondern von zahlreichen Membranen durchzogen, die verschiedene Typen von Membrankörpern enthalten. Den Hauptwiderstand beim Zellaufschluss stellt jedoch die Zellhülle dar, die das Cytoplasma umfasst und die intrazellulären Wertstoffe daran hindert, in das Medium zu diffundieren. Die Stabilität der Zellwände ist jedoch von vielen Faktoren abhängig. Neben der Gattung der Mikroorganismen haben auch die Fermentationsbedingungen einen Einfluss auf die Zellwände. Hull und Middelberg stellten fest, dass Zellen in der Phase der Teilung (vornehmlich also in der Wachstumsphase) besser im Hochdruckhomogenisator aufgeschlossen werden können, als Zellen in der stationären Phase [Hull und Middelberg, 1993].

2.1.1.1 Zellwandaufbau Gram positiver und Gram negativer Bakterien

Bei den Bakterien werden die Zellen abhängig von ihrem Zellwandaufbau in Gram positive (G+) und Gram negative (G-) Typen klassifiziert. Diese Bezeichnung geht auf das von Gram (1884) eingeführte Färbeverfahren zurück, bei dem die Anfärbbarkeit der Zellwand mit einem Kristallviolett/Iod Lack überprüft wird. In Abb. 3 ist der unterschiedliche Aufbau der Zellwände schematisch dargestellt.

Das Innere der Zelle ist von der Cytoplasmamembran umfassen. Sie besteht aus einer Lipiddoppelschicht, wobei die hydrophilen Köpfe der Phospholipide nach außen weisen. Die Cytoplasmamembran kontrolliert den Ein- und Austritt von Stoffen in der Zelle. Zu diesem Zweck ist sie mit Brückenproteinen durchsetzt, die einen spezifischen Stofftransport ermöglichen.

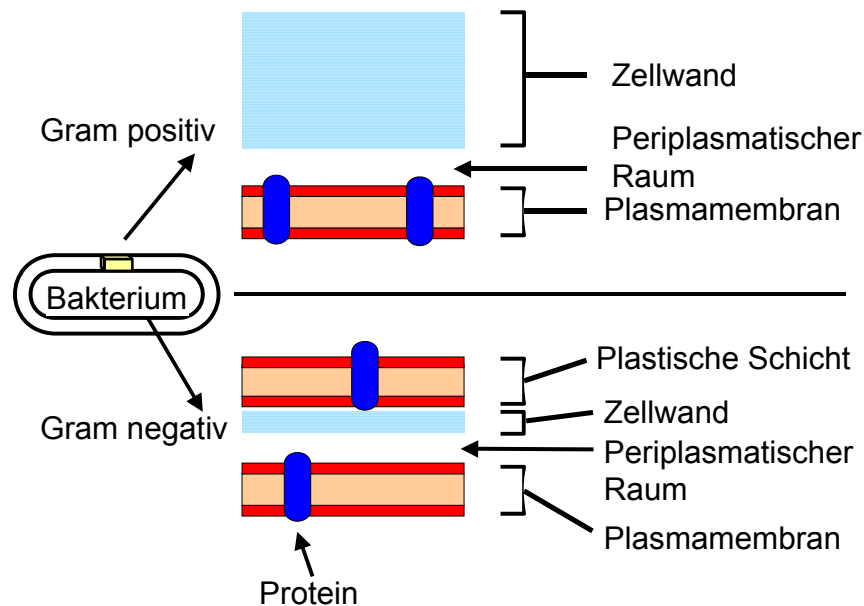


Abb. 3: Schematischer Aufbau einer Gram positiven und einer Gram negativen Zellhülle im Vergleich

Das Stützskelett der Zellhülle ist die Zellwand. Sie besteht aus einer alternierenden Folge von N-Acetylglucosamin und N-Acetylmuraminsäure. Die Ketten dieses aus 50 bis 500 Einheiten bestehenden Heteropolymers sind untereinander peptidisch verknüpft. Sie bilden miteinander ein sackförmiges Riesenmolekül, den Murein-Sacculus. In ihm sind die Peptidbindungen parallel zur Längsachse, und die Heteropolymerketten quer zur Längsachse ausgerichtet (Abb. 4). Durch diese Anordnung entsteht eine Anisotropie bezüglich der mechanischen Eigenschaften von Zellen.

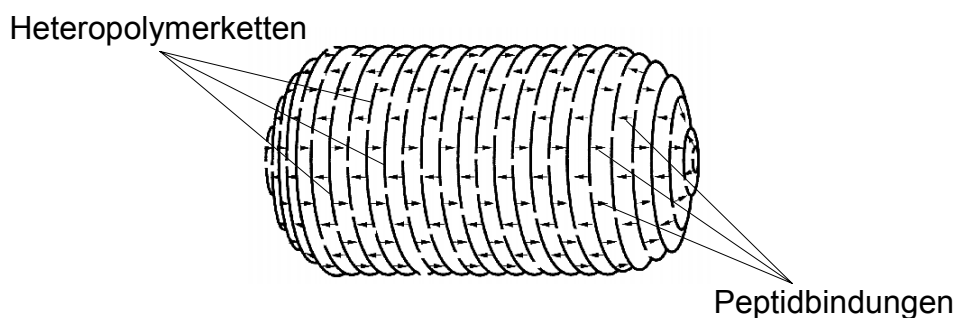


Abb. 4: Schematische Zeichnung der Architektur eines Murein-Sacculus: Die parallelen Linien repräsentieren einige wenige Heteropolymerstränge, die Pfeile die Peptidbrücken [Höltje, 1998]

Bei Gram negativen Zellen besteht die Zellwand aus wenigen Lagen Murein. Bei Gram positiven Zellen können es bis zu 40 Schichten sein. Dies ist auch der Grund für die Tatsache, dass Gram positive Zellen deutlich schwerer zu zerkleinern sind. Bei Gram negativen Zellen liegt auf der Mureinschicht noch die plastische Schicht (auch äußere Membran genannt).

Theoretische Grundlagen

Ein Teil der in ihr enthaltenen Lipoproteine, Lipopolysaccharide (u.a. Endotoxine) und anderen Lipide ist kovalent an die Mureinschicht gebunden. Die plastische Schicht macht bis zu 80% der Trockenmasse der Zellwand Gram negativer Bakterien aus und benötigt mehrwertige Ionen zur Stabilisierung.

2.1.1.2 Zellwandaufbau von Hefe

Der Zellwandaufbau von Hefe unterscheidet sich deutlich von dem der Bakterien (Abb. 5). Einer Phospholipidmembran folgen mehrere Schichten verschiedener Polysaccharide. Aus diesem Grund wird für den enzymatischen Zellaufschluss ein anderes Enzym gewählt als bei Bakterien (siehe: 2.1.4.1, S. 8)

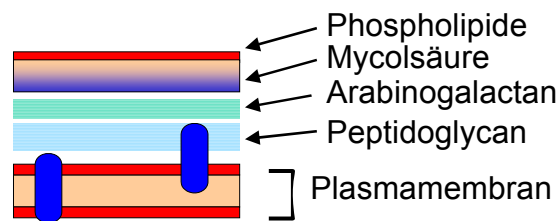


Abb. 5: Schematischer Aufbau der Zellwand einer Hefezelle

Im Allgemeinen leistet die Hefe aufgrund ihres Zellwandaufbaus deutlich mehr Widerstand gegen einen Zellaufschluss als Gram negative Bakterien.

2.1.2 Messung des Zellaufschluss Erfolgs

Zur Messung des Zellaufschluss Erfolgs gibt es direkte und indirekte Methoden. Direkte Methoden beruhen auf der Zählung intakter Zellen, während bei indirekten Methoden die Freisetzung bestimmter Zellinhaltsstoffe gemessen wird.

Zur Zählung intakter Zellen kann z.B. die Lichtmikroskopie oder auch die Lebendkeimzahlbestimmung herangezogen werden. Diese Methoden sind in der Durchführung jedoch recht aufwändig und langwierig. So muss zur Bestimmung der Lebendzellzahl unter dem Mikroskop zunächst eine Anfärbung der noch lebenden Mikroorganismen durchgeführt werden, um die leicht beschädigten Bakterien von den unversehrten unterscheiden zu können. Die Bebrütung von Nährböden zur Lebendkeimzahlbestimmung bringt erhebliche Wartezeiten mit sich. Bei allen direkten Methoden muss stets darauf geachtet werden, dass eine ausreichende Anzahl von Mikroorganismen untersucht wird, da diese Verfahren sonst einen zu großen statistischen Fehler aufweisen.

Indirekte Methoden arbeiten in der Regel zuverlässiger und sind weniger aufwändig. Als Beispiele seien hier die Bestimmung des freigesetzten Proteins, des freigesetzten Stickstoffs oder der freigesetzten Aktivität eines bestimmten Enzyms genannt. Auch die Messung der Leitfähigkeit kann als Kriterium zur Bestimmung des Zellaufschluss Erfolgs herangezogen werden, sofern sich der intrazelluläre Salzgehalt von dem des Mediums unterscheidet. Das relative Konzentrationsmaß für freigesetzte, intrazelluläre Stoffe wird häufig als Aufschlussgrad (A) angegeben.

$$A = \frac{c - c_0}{c_{\max} - c_0} \cdot 100$$

Gleichung 1

Bei der Berechnung des Aufschlussgrades bereitet häufig die Bestimmung der maximalen Proteinkonzentration c_{\max} Schwierigkeiten. Die Bestimmung dieses Wertes setzt voraus, dass die während des Aufschlusses freigesetzten Zellinhaltsstoffe erhalten bleiben und nicht durch die Zellaufschlussmethode geschädigt werden. Sollte z.B. eine Enzymaktivität als Indikator für den Aufschlussgrad dienen, so darf die Freisetzung nicht von einer Denaturierung überlagert werden, da sonst der Maximalwert nicht erreicht wird. Verlässlicher ist in solch einem Fall die Bestimmung des Gesamtstickstoffgehalts nach Kjeldahl. Diese gilt zwar nicht als ausgesprochen genau, sie umgeht jedoch die Probleme, die mit der Denaturierung von Proteinen einhergehen [Middelberg, 1998].

2.1.3 Chemische Methoden des Zellaufschlusses

Chemische Methoden zur Freisetzung intrazellulärer Stoffe werden zumeist bei Gram negativen Bakterien angewandt. Einige von ihnen haben spezifische Wirkungen gegen einzelne Bestandteile der Zellwand. Daher führen sie häufig lediglich zu einer Permeabilisierung der Zellwand, so dass intrazellulär gelöste Stoffe aus der Zelle herausdiffundieren können.

2.1.3.1 Antibiotika

Einige Antibiotika wie z.B. Penicillin greifen in die Transpeptidierung der Peptidoglykanstränge der Zellwand ein. Dadurch wird der Aufbau einer intakten Zellwand verhindert. Die Cytoplasmamembran bleibt jedoch unbeschadet, so dass die Zellen trotz defekter Zellwand noch eine Weile überlebensfähig sind. Zellen in der stationären Phase werden in der Regel nicht betroffen, da lediglich der Aufbau neuer Zellwände gestört wird. Aufgrund der hohen Kosten von Antibiotika ist die Anwendung im industriellen Maßstab unüblich.

2.1.3.2 Chelatbildner

Die plastische Schicht Gram negativer Bakterien wird durch mehrwertige Kationen wie Mg^{2+} und Ca^{2+} stabilisiert. Durch Zugabe von Chelatbildnern wie z.B. Ethylendiamintetraacetat (EDTA) werden diese Ionen aus der plastischen Schicht entfernt und diese damit destabilisiert. Die Folge ist eine Freisetzung der Lipopolysaccharide (die auch die Endotoxine Gram negativer Zellen stellen). Ferner können nun periplasmatische Enzyme durch die dünne Mureinschicht in das Medium diffundieren oder die Mureinschicht durch Enzyme angegriffen werden.

2.1.3.3 Chaotrope Agenzien

Als chaotrope Agenzien werden Substanzen bezeichnet, die die Wasserstoffbrücken zwischen Wassermolekülen beeinflussen. Diese Substanzen verringern die Ordnung einer Struktur (erhöhen also das Chaos), indem sie Wasserstoffbrücken aufbrechen und hydrophobe Interaktionen stören können.

Theoretische Grundlagen

Aufgrund der veränderten Lösungseigenschaften des Wassers werden transmembrane Proteine effektiv herausgelöst. Eine Freisetzung intrazellulärer Proteine wird in der Regel erst durch Kombination mit anderen Reagenzien (wie z.B. Triton X-100 oder EDTA) erreicht.

Die am häufigsten verwendeten Solventien sind Guanidiniumchlorid (GmCl) und Harnstoff, wobei die Verwendung aufgrund der hohen gebräuchlichen Konzentrationen im Wesentlichen auf die Produktion von pharmazeutischen Wirkstoffen beschränkt ist.

2.1.3.4 Detergenzien

Detergenzien wie Natriumdodecylsulfat (SDS) oder Triton X-100 greifen die Lipidkomponenten der Zellen an. Bei Gram negativen Zellen wird die Cytoplasmamembran jedoch durch die Lipopolysaccharide der plastischen Schicht geschützt. Allgemein werden Detergenzien eher zur Aufarbeitung zellwandassoziiierter Proteine verwandt. In Kombination mit anderen Agenzien können sie jedoch auch zum Zellaufschluss eingesetzt werden.

2.1.3.5 Alkalische Behandlung

Die alkalische Lyse der Zellwand ist eine einfache und billige Methode zur Freisetzung intrazellulärer Wertstoffe. Sie basiert auf der Verseifung der Lipidbausteine der Zellwand. Es ist jedoch zu berücksichtigen, dass das Produkt diesen harschen Bedingungen standhalten muss.

2.1.4 Biologische Methoden des Zellaufschlusses

Biologische Aufschlussmethoden sind im Allgemeinen sehr selektiv und werden unter sehr milden Bedingungen durchgeführt. Trotzdem vermögen sie Zellen effektiv aufzuschließen.

2.1.4.1 Enzymatischer Zellaufschluss

Lysozym (Muramidase, N-Acetylmuramoyl-Hydrolase) ist ein aus dem Hühnereiweiß gewonnenes Enzym und löst das Mureingerüst der Bakterienzellwände auf. Daher wirkt es besonders gut bei Gram positiven Bakterien. Das Murein bei Gram negativen Bakterien ist durch die plastische Schicht geschützt. Hier ist eine Vorbehandlung mit Chelatbildnern (z.B. EDTA) notwendig.

Zum Aufschluss von Hefezellen wird das Enzym Zymolyase verwandt.

2.1.4.2 Phagen

Der Zellaufschluss mit Hilfe lytischer Phagen wird zur Zeit nur im Labormaßstab durchgeführt. Die Phagen infizieren die Zellen, vermehren sich in diesen und lysieren sie anschließend. Ein intrazelluläres Produkt würde dabei freigesetzt werden, doch dürfte die Zelle durch die Belastung der Phagenproduktion nur verhältnismäßig wenig Produkt bilden. Eine Möglichkeit, dies zu umgehen, wäre der Einsatz genetisch modifizierter lysogener Phagen, die mit dem Genom der Wirtszelle vermehrt werden und auf ein Signal hin lediglich die Lyse der Zelle hervorrufen, ohne sich zuvor selbst zu replizieren.

2.1.4.3 Autolyse

Alle Mikroorganismenkulturen haben die Eigenschaft, nach Erreichen der stationären Phase in eine Absterbephase überzugehen. Während der Absterbephase werden die Zellen von innen her lysiert. Bei *E. coli* tritt schon zwei Stunden nach Erreichen der stationären Phase eine starke Autolyse auf. Sie kann aber auch mittels eines Hitzeschocks induziert werden. In den meisten Fällen ist die Autolyse eher ein ungewolltes Phänomen, als dass sie zum konsequenten Aufschluss von Zellen verwendet wird, da während der Autolyse eine besonders hohe proteolytische Aktivität zu beobachten ist. Hefeextrakt wird durch Autolyse hergestellt.

2.1.5 Physikalische Methoden

2.1.5.1 Thermolyse

Neben der Induktion der Autolyse (siehe 2.1.4.3) durch Hitzeschock kann eine Hitzebehandlung die Zellen auch direkt aufschließen. Periplasmatische Proteine werden von *E. coli* bei Temperaturen von 50 - 55°C freigesetzt. Eine zehnminütige Behandlung bei 90°C führt zur Freisetzung von cytoplasmatischen Proteinen. Der Erfolg ist von vielen Faktoren abhängig: der Heizrate, dem Stamm, dem genauen Aufbau der Zellwand und der Temperatur, bei der die Organismen zuvor gelagert wurden. Bei dieser Methode entstehen große Zelltrümmer, allerdings steigt die Viskosität aufgrund der freigesetzten, unbeschädigten DNA stark an.

2.1.5.2 Einfrieren/Auftauen

Durch den Prozess des Einfrierens und Auftauens werden die Zellen aufgrund der Bildung von Eiskristallen und der daher resultierenden Volumenvergrößerung des Wassers aufgeschlossen. Die Methode ist sehr schonend, die Effizienz jedoch gering.

2.1.5.3 Dekompression

Bei dieser Methode wird die Zellsuspension mit superkritischem Kohlenstoffdioxid in Kontakt gebracht. Nach einer bestimmten Zeit wird der Druck stark verringert. Das Gas, das auch in die Zellen diffundiert ist, perlt aus und bringt so die Zellen zum Platzen.

Theoretische Grundlagen

2.1.6 Mechanische Methoden des Zellaufschlusses

Bei Anwendung mechanischer Methoden zum Zellaufschluss reißen die entstehenden Spannungen und Dehnungen die Zellwände der Mikroorganismen auseinander. Diese Methoden werden immer dann benötigt, wenn intrazelluläre Produkte als Einschlusskörper (Inclusion Bodies) vorliegen, da diese nicht durch eine permeabilisierte Zellwand hindurch diffundieren können. Aber auch in anderen Fällen kommen mechanische Methoden des Zellaufschlusses zum Einsatz, da sie sich für den Einsatz im großen Maßstab bewährt haben.

2.1.6.1 Beanspruchungsarten des mechanischen Zellaufschlusses

Mechanische Beanspruchung

Bei der mechanischen Beanspruchung von Partikeln werden Kräfte von den Zellaufschlussgeräten auf die Partikel übertragen. Nach Rumpf [Rumpf, 1965] können vier Beanspruchungsarten definiert werden (Abb. 6).

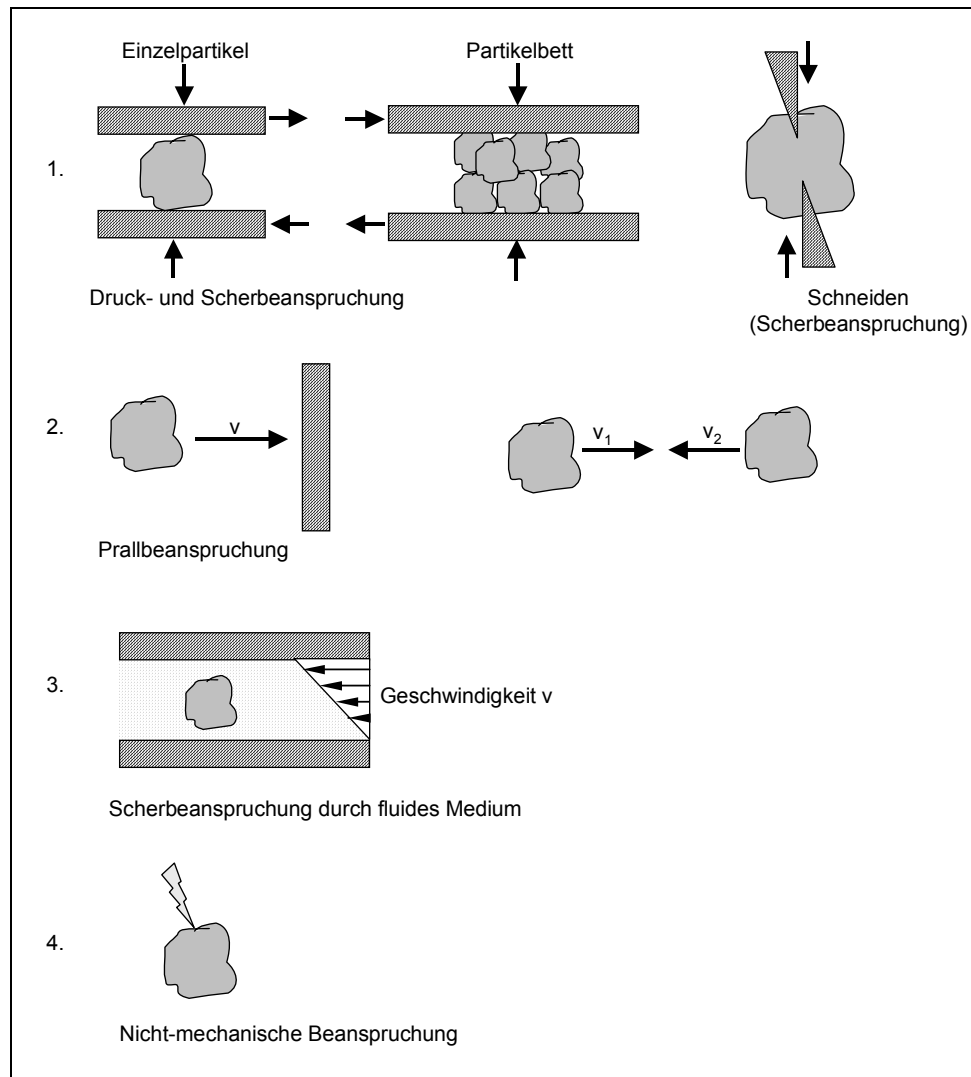


Abb. 6: Hauptbeanspruchungsarten von Partikeln in der Zerkleinerungstechnik

Beim mechanischen Zellaufschluss treten hauptsächlich die Beanspruchungsarten "Druck- und Scherbeanspruchung" (1.) und "Beanspruchung durch das umgebende Medium" (3.) auf.

Beanspruchung durch Kavitation

Die Kavitation tritt sowohl bei der Verwendung des Ultraschallhomogenisators als auch beim Einsatz des Hochdruckhomogenisators auf. Aus diesem Grund wird hier näher darauf eingegangen.

Der Begriff Kavitation bedeutet lediglich Blasenbildung (inkl. Wachstum und Kollaps der Blase) in einem fluiden Medium. Diese Blasenbildung kann mehrere Gründe haben [Shah et al., 1999]:

- Hydrodynamische Kavitation wird durch eine Druckdifferenz in einem bewegten fluiden Medium erzeugt.
- Akustische Kavitation wird durch Schallwellen erzeugt, die das Medium durchlaufen.
- Optische Kavitation wird durch Einwirkung von Laserlicht hervorgerufen
- Partikuläre Kavitation resultiert aus dem Beschuss eines Fluids mit Elementarteilchen.

Für den Zellaufschluss kommen lediglich die ersten beiden Formen der Kavitation zum Einsatz. Die letzten beiden Formen werden lediglich zum Studium der Kavitation eingesetzt. Das Wachstum von Kavitationsblasen kann mehrere Gründe haben:

- Druckverringern an einer Gas gefüllten Blase: Gasförmige Kavitation
- Druckverringern an einer Dampfblase: Dampförmige Kavitation
- Diffusion von gelöstem Gas in eine Gasblase: Entgasung
- Ausreichende Temperaturerhöhung in einer Dampf gefüllten Blase: Kochen

Die maximale Größe einer Kavitationsblase bestimmt die Höhe des Druckimpulses bei der Implosion der Blase. Sie ist daher von großer Bedeutung. Aber auch die Zusammensetzung der Blase ist wichtig. Sollte in eine dampfförmige Blase, die durch Druckverringern entstanden ist, gelöstes Gas diffundieren, so wird bei anschließender Druckerhöhung der Kollaps der Blase nicht so heftig ausfallen, wie bei einer reinen Dampfblase. Aus diesem Grund kann die Effektivität des Zellaufschlusses durch Kavitationsereignisse erhöht werden, wenn die Suspension zuvor entgast wird.

Hydrodynamische Kavitation in Rohren oder Ventilen entsteht durch eine Reduzierung des statischen Drucks unter den Dampfdruck der Flüssigkeit. Dies kann z.B. der Fall sein, wenn ein schnell fließendes Fluid aus einem Ventil herausströmt. Die schlagartige Querschnittserweiterung führt zu einem Unterdruck direkt hinter dem Ventil. Dieser ist deutlich geringer als der Außendruck.

Theoretische Grundlagen

Als Beispiel sei hier die Wasserstrahlpumpe genannt, bei der dieser Unterdruck ausgenutzt wird, um Luft anzusaugen, obwohl das Wasser gegen einen Außendruck von etwa 1 bar gepumpt wird.

Akustische Kavitation wird in wässrigen Medien von Ultraschallwellen (20 kHz bis 1 MHz) hervorgerufen. Schallwellen jeglicher Frequenz durchlaufen elastische Medien als Longitudinalwellen in Form einer Serie von hohen und niedrigen Druckbereichen. Dabei kann der Druck leicht unter den Dampfdruck der Flüssigkeit sinken und somit Kavitationsblasen erzeugen. Insbesondere Verunreinigungen wie Staub oder Gasbläschen bilden ideale Startpunkte für die Kavitation, da an diesen Stellen die Bindungskräfte der Flüssigkeit gestört sind.

Entsprechend den eingetragenen Schallwellen wird die Kavitationsblase nun größer und kleiner. Insgesamt wächst sie aber bis zu einer kritischen Größe (ca. 150 μm), an der sie dann implodiert [Neis und Thiem, 1999]. Dabei entstehen in der Blase sehr hohe Temperaturen (bis 5000 K) und hohe Drücke (bis 500 bar). Wasserstoff- und Hydroxidradikale sind die Folge. Um eine Denaturierung des Produkts zu vermeiden, ist die Zugabe von Radikalfängern wie Glutathion empfehlenswert. Ferner entstehen durch den Kollaps der Kavitationsblase Wirbel mit hohen Scherkräften. Implodieren die Kavitationsblasen in der Nähe von Wänden, so kann nicht von allen Seiten gleichmäßig die Flüssigkeit nachfließen, und es bleibt ein Impuls der Flüssigkeit auf die Wand übrig [Portenlänger, 1999]. Dieser Flüssigkeitsstrahl (auch Microjet genannt) kann Geschwindigkeiten von über 100 m/s annehmen und ist für die Kavitationskorrosion an Schiffsschrauben etc. verantwortlich.

Für den Zellaufschluss werden verschiedene Beanspruchungsmöglichkeiten in Betracht gezogen. Zum einen werden Microjets für die Öffnung der Zellen verantwortlich gemacht. Dabei schlägt der Flüssigkeitsstrahl ein Loch in die Zellwand. Andere Autoren machen Scherkräfte von Wirbeln, die aus implodierenden Kavitationsblasen stammen, für den Zellaufschluss verantwortlich [Doulah, 1977]. Eigene Untersuchungen weisen daraufhin, dass die Zellen aufgrund des Dampfdrucks der eingeschlossenen Flüssigkeit platzen, wenn die Zelle in Kontakt mit einer wachsenden Kavitationsblase kommt [Kampen et al., 2004]. Diese These wird durch die Überlegung gestützt, dass Zellen ebenfalls als Kavitationskeime dienen können.

Beanspruchung durch turbulente Strömung

Neben der Kavitation können auch Turbulenzfelder hoher Energiedichte für den Zellaufschluss verantwortlich sein [Büschelberger, 1987]. Die bei der Turbulenz auftretenden Wirbel haben abhängig von ihren Abmessungen unterschiedliche Wirkung auf die Mikroorganismen. Sind die Wirbel deutlich größer als der Mikroorganismus, so wird eine Zelle, die in den Wirbel gerät, praktisch von einem laminaren Geschwindigkeitsgradienten beansprucht [Kramer, 1987]. Bei kleinen, dissipativen Wirbeln werden die Bakterien zwischen den Wirbeln geschert.

Ob Bakterien den Strömungen standhalten können, kann über die Weberzahl abgeschätzt werden. Die Weberzahl stammt aus der Emulgier- bzw. Sprühtechnik. Sie beschreibt das Verhältnis von Trägheitskraft zu Oberflächenkraft.

$$We = \frac{\rho \cdot w^2 \cdot l}{\sigma}$$

Gleichung 2

Die Zelle wird in diesem Fall als Tropfen mit einer Oberflächenspannung entsprechend der Stabilität der Zellwand angesehen.

2.1.6.2 Mechanische Eigenschaften von Mikroorganismen

Die mechanischen Eigenschaften von Mikroorganismen wurden zumeist durch Mikromanipulation untersucht. Dabei wird eine einzelne Zelle zwischen zwei Stempeln positioniert und anschließend zusammengepresst. Aus dem Kraft-Weg-Diagramm kann daraufhin die Kraft ermittelt werden, die zum Platzen der Mikroorganismen notwendig war.

Bei der Beanspruchung kommt es zunächst zu einer elastischen Verformung der Mikroorganismen. Diese Deformation kann bis zu 50% des Durchmessers der Zelle betragen, ist aber stark von der Osmolarität des Mediums abhängig. Einen weiteren Einfluss auf die Deformation hat die Geschwindigkeit der Beanspruchung. Während des Beanspruchungszeitraums verlieren die Zellen Wasser. Versuche, in denen der Stempel angehalten wurde, zeigten, dass die Kraft auf den Stempel geringer wurde. Auf die Kräfte, die zum Bersten der Zellen notwendig sind, hat die Geschwindigkeit im untersuchten Bereich (zwischen 1,03 und 1,68 µm/s) aber keinen Einfluss [Smith et al., 2000]. Die Berstkräfte, die von verschiedenen Autoren gemessen wurden, sind in Tab. 1 angegeben.

Tab. 1: Literaturdaten zur Berstkraft von Zellen

Berstkraft	Anmerkungen	Literaturstelle
Hefe 55 - 175 µN	Hefezellen aus stationärer Phase mit Formaldehyd behandelt	[Mashmouhy et al., 1998].
Hefe 40 - 80 µN		[Posten]
Hefe 45 - 145 µN	Berstkraft unabhängig vom Zelldurchmesser	[Smith et al., 2000]
Hefe 50 - 120 µN	Berstkraft steigt mit Zelldurchmesser	[Srinorakutara, 1998]
<i>E. coli</i> 3,6 µN	Gram negativ	[Shiu et al., 1999]
<i>Staphylococcus epidermis</i> 13,8 µN	Gram positiv	[Shiu et al., 1999]
Tomatenzellen 5 mN	Wurzelzellen, in Suspension gezüchtet, Durchmesser ca. 70 µm	[Thomas et al., 2000]
Säugerzellen 1,5 - 4,5 µN		[Mashmouhy et al., 1998; Posten, 2002]

Theoretische Grundlagen

Die Höhe der Berstkraft ist von vielen Faktoren abhängig. Neben der Art des Mikroorganismus spielen auch die Fermentationsbedingungen, die Wachstumsphase und der osmotische Druck des umgebenden Mediums eine große Rolle. Srinorakutara untersuchte die Berstkraft bei Hefezellen in verschiedenen Wachstumsphasen. Er stellte fest, dass die Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase am stabilsten sind. Mittels Elektronenmikroskopie bestimmte er auch die Zellwanddicke. Dabei stellte sich heraus, dass die Zellwand in der exponentiellen Wachstumsphase am dünnsten ist [Srinorakutara, 1998]. Dieser Widerspruch ist dadurch zu erklären, dass die Zellen in der exponentiellen Phase den größten Durchmesser haben, denn es wird mehr Kraft benötigt, um in einer großen Zelle den gleichen Druck aufzubauen wie in einer kleinen Zelle.

Eine weitere Vorgehensweise zur Messung der mechanischen Stabilität von Zellen ist die Beanspruchung in einem Rotationsviskosimeter. Messungen belegen, dass Hefezellen Schubspannungen von 17000 Pa standhalten können [Tonnius, 1982].

Neben Hefezellen wurde die Berstkraft bereits bei einer ganzen Reihe anderer Zellen untersucht (Siehe Tab. 1). Ein Überblick ist in der Literatur zu finden [Thomas et al., 2000]. Aus den Kraft-Weg Kurven ist es mit Hilfe eines linearen, elastischen Modells möglich, den Elastizitätsmodul zu bestimmen [Wang et al., 2004].

2.1.6.3 Zellaufschluss mittels Hochdruckhomogenisator

Hochdruckhomogenisatoren wurden ursprünglich für die Feinverteilung von Fetttropfchen in Milch entwickelt, um das Aufrahmen des Milchfetts zu verhindern. Sie gehören zu der Gruppe der Strömungsdispergiermaschinen, die nach dem Druckentspannungsprinzip arbeiten. Zu ihrem charakteristischen Aufbau gehören zwei Funktionseinheiten: Eine Hochdruckkolbenpumpe und ein Homogenisierventil. Die Hochdruckkolbenpumpe sorgt mit Hilfe mehrerer Kolben für einen druckunabhängigen und nahezu pulsationsfreien Volumenstrom. Es können Drücke bis zu 1000 bar, bei Homogenisatoren im Labormaßstab sogar bis 2000 bar aufgebaut werden. Der Durchsatz von Technikums- und Produktionsanlagen reicht von 30 l/h bis 8000 l/h [Marczinczik, 2004].

Im Ventil des Hochdruckhomogenisators wird durch das Aufpressen des Ventilkörpers auf den Ventilsitz der Homogenisierspalt so weit verengt, bis sich der gewünschte Druckverlust eingestellt hat. Das Fluid durchströmt den Ventilsitz und fließt dann radial durch den nur wenige Mikrometer breiten Homogenisierspalt (Abb. 7). Dabei verändert sich die Fluidgeschwindigkeit von etwa 6 m/s auf bis zu 300 m/s. Nach dem Verlassen des Homogenisierspalts prallt das Fluid auf den Prallring und verlässt anschließend das Ventil über einen Auslass.

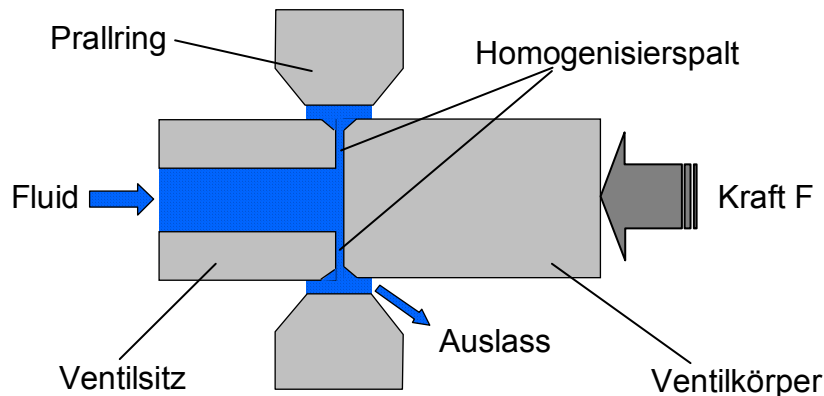


Abb. 7: Schematischer Aufbau eines Hochdruckhomogenisatorventils

Die Ventilgeometrie eines Hochdruckhomogenisators ist von entscheidender Bedeutung für den Zellaufschluss. Es sind über 150 verschiedene Ventilgeometrien patentiert. Sie bestehen in der Regel aus Hartmetall oder für den Einsatz bei abrasiven Suspensionen, wie z.B. Inclusion Bodies, aus Keramik.

Das Aufschlussprinzip in Hochdruckhomogenisatoren

In Hochdruckhomogenisatorventilen werden die Zellen von einer ganzen Reihe von Kräften beansprucht. Dazu zählen die Scherkräfte der Flüssigkeit an den Ventilwänden, die Prallbeanspruchung am Prallring, die Geschwindigkeitsänderungen des Fluids, die Turbulenz und die Kavitation [Brookman, 1974].

Welche dieser Beanspruchungen ausschlaggebend für die Zerkleinerung von Zellen ist, wurde von verschiedenen Autoren, zumeist am Beispiel von Hefe, diskutiert.

Zur Bestimmung des Einflusses der Scherströmung wurden Hefezellen in einem Rotationsviskosimeter einer Schubspannung von 17000 Pa ausgesetzt [Tonnius, 1982]. Die Hefezellen konnten mit dieser Methode nicht aufgeschlossen werden. Säugerzellen hingegen wurden bereits bei einer Schubspannung von 500 Pa abgetötet. Da Tonnius für die Scherströmung im Homogenisierspalt nur eine Schubspannung von 16000 Pa berechnete, schloss er diese als Ursache für den Hefezellaufschluss aus. Ein weiterer Punkt, der diese These unterstreicht, ist die Tatsache, dass der Aufschlussgrad der Hefesuspension weitgehend unabhängig vom Biotrockenmassegehalt ist. Wäre die Scherströmung für den Aufschluss verantwortlich, so müsste die steigende Viskosität Einfluss auf den Aufschlussgrad haben.

Aus der Emulgiertechnik ist bekannt, dass bei turbulenter Strömung Druckdifferenzen an der Oberfläche von Flüssigkeitskugeln entstehen, die zu einer starken Verformung und schließlich zu einer Zerteilung der Kugeln führt [Kurzthals, 1977]. Mit Hilfe einer Düse zur Kavitationsunterdrückung wurde aber festgestellt, dass das Ergebnis der Emulgierung eines Wasser/Öl Gemisches unabhängig davon war, ob im Spalt laminare oder turbulente Strömung vorherrschte. Als wichtig erwies sich lediglich der Energieeintrag [Kiefer, 1977].

Theoretische Grundlagen

Dass Kavitationserscheinungen den Zellaufschluss positiv beeinflussen, ist in vielen Veröffentlichungen zu lesen. Büschelberger konstruierte ein Homogenisierventil, in dem der Stempel von einer zweiten, separat einstellbaren Düse umschlossen war. Durch diese Anordnung konnte ein Druck direkt nach Verlassen des Homogenisierspalts aufgebracht werden. Ab einem Druck von etwa 80 bar verringerte sich die Effizienz des Aufschlusses um etwa 30%. Dies führte Büschelberger auf eine Reduktion der Kavitationserscheinungen aufgrund des Drucks zurück [Büschelberger, 1987].

Die Prallbeanspruchung am Prallring wurde von vielen Autoren aufgrund der geringen Größe der Hefezellen und des geringen Dichteunterschieds zum Medium für unwahrscheinlich erklärt. Untersuchungen, in denen Prallringe unterschiedlichen Innendurchmessers verwandt wurden, zeigten jedoch, dass der Abstand zwischen Homogenisierspalt und Prallring von entscheidender Bedeutung für den Zellaufschluss ist. Bei Versuchen mit *E. coli* sank der Aufschlussgrad von 95% auf 75%. Bei Hefe sank der Aufschlussgrad sogar auf etwa 50% [Kleinig et al., 1996]. Dies zeigt deutlich, dass die Prallbeanspruchung der Zellen auf dem Prallring einen großen Einfluss hat, aber auch nicht allein für den Aufschluss verantwortlich ist. Ferner kann aus diesen Ergebnissen gefolgert werden, dass Zellen, die verhältnismäßig schwer aufzuschließen sind (in diesem Fall Hefe), bevorzugt am Prallring aufgeschlossen werden. Eventuell bewirken bei den beiden Organismen auch unterschiedliche Mechanismen den Zellaufschluss.

Aufschlusskinetik in Hochdruckhomogenisatoren

Ein weit verbreitetes Modell für die Aufschlusskinetik stammt aus dem Jahr 1971 [Hetherington et al., 1971].

$$\ln\left(\frac{100}{100-A}\right) = k_1 \cdot N \cdot p^a \quad \text{Gleichung 3}$$

In Gleichung 3 hängt der Aufschlussgrad (A) lediglich von der Anzahl der Durchläufe durch den Homogenisator (N) und dem Druck (p) ab. Die zwei empirischen Parameter a und k_1 basieren auf einer ganzen Reihe von Faktoren, wie dem Typ der Zelle, ihrer Wachstumsphase, der Zusammensetzung des Wachstumsmediums in dem der Mikroorganismus fermentiert wurde, dem Design des Homogenisierventils, der Temperatur und auch der Biotrockenmasse [Jahnke, 1998; Middelberg, 1998]. Kleinig erweiterte diese Gleichung mit einem weiteren Term auf der rechten Seite, um den Abstand von Homogenisierspalt und Prallring zu berücksichtigen [Kleinig et al., 1996].

Eine genauere Vorhersage des Aufschlussgrades liefert das so genannte "wall-strength model" [Middelberg, 1993].

$$A = 1 - \int_0^\infty [1 - f_D(S)]^N f_S(S) dS \quad \text{Gleichung 4}$$

Theoretische Grundlagen

In dieser Gleichung ist der Aufschlussgrad (A) von der effektiven Zellstabilität (S) abhängig. $f_S(S)$ beschreibt die Verteilung der Zellstabilität (Gleichung 6) und $f_D(S)$ die Beanspruchungsverteilung des Homogenisators (Gleichung 5).

$$f_D(S) = \frac{(m \cdot p^n)^d}{S^d + (m \cdot p^n)^d} \quad \text{Gleichung 5}$$

Die Parameter m, n und d sind systemspezifisch, jedoch nicht abhängig von den beanspruchten Mikroorganismen. Als Funktion für die Verteilung der Zellstabilität wird eine einfache Gausverteilung herangezogen:

$$f_S(S) = \frac{1}{\sigma \cdot \sqrt{2\pi}} \cdot \exp\left[-\frac{(S - \bar{S})^2}{2\sigma^2}\right] \quad \text{Gleichung 6}$$

σ^2 gibt die Varianz der Verteilung der Zellstabilität an. Die mittlere Zellstabilität (\bar{S}) ist also bei der Beanspruchung eines bestimmten Stammes in einem bestimmten Homogenisator die einzige unbekannte Variable und kann über die mittlere Länge der Zellen sowie über die Vernetzung des Peptidoglycans der Zellwand ermittelt werden [Middelberg und O'Neill, 1993].

In den Hochdruckhomogenisator eingetragene spezifische Energie

Die eingetragene Energie, bezogen auf den Biotrockenmassegehalt, berechnet sich wie folgt:

$$E_{\text{spez}} = \frac{\Delta p}{c_{\text{BTM}}} \cdot N \quad \text{Gleichung 7}$$

Die eingetragene spezifische Energie ist also dem Druckverlust (Δp) direkt proportional.

Einflussparameter auf den Zellaufschluss im Hochdruckhomogenisator

- **Biotrockenmassekonzentration des Zulaufs**
Der Aufschlussgrad ist in weiten Bereichen (3,5% bis 24% Biotrockenmasse) unabhängig von der Biotrockenmassekonzentration [Brookman, 1974]. Es sollten also immer Suspensionen mit hohem Biotrockenmassegehalt zum Einsatz kommen, um die eingebrachte Energie besser auszunutzen.
- **Zulauftemperatur**
Die Zulauftemperatur der Biomassensuspension hat nur wenig Einfluss auf die Effektivität des Zellaufschlusses. Allerdings ist zu beachten, dass pro 100 bar Druckabfall die Temperatur der Suspension um ca. 2,4°C steigt und somit die Gefahr besteht, dass hitzeempfindliche Produkte denaturiert werden.
- **Osmotische Effekte**
Osmotische Effekte haben einen erstaunlich hohen Einfluss auf das Zerkleinerungsergebnis. Der Vergleich des Aufschlusses von Hefezellen in demineralisiertem Wasser und in dreiprozentiger Natriumchloridlösung zeigte, dass der

Theoretische Grundlagen

Aufschlussgrad durch das Natriumchlorid halbiert wurde. Vergleiche mit anderen Salzen bestätigten diesen Versuch. Ferner wurde eine Zeitabhängigkeit für diesen Effekt festgestellt, da zunächst das Wasser aus der Zelle hinausdiffundieren muss [Büschelberger, 1987]. Zur Verbesserung der Zellaufschlusseffektivität sollte also die Biomasse nach der Fermentation abzentrifugiert und in Wasser mit niedrigem Salzgehalt wieder resuspendiert werden.

- **pH-Wert**
Der pH-Wert hat nur geringen Einfluss auf das Zellaufschlussresultat. Er kann jedoch zur chemischen Lyse der Zellen führen und so den Zellaufschluss im Hochdruckhomogenisator unterstützen. Es ist aber darauf zu achten, dass das Produkt bei den eingestellten pH-Werten nicht geschädigt wird.
- **Viskosität**
Versuche mit Hefezellsuspensionen, deren Viskosität mit Carboxymethylcellulose erhöht war, führten bei gleichen Druckverlusten zu gleichen Aufschlussgraden [Büschelberger, 1987].
- **Vorbehandlung**
Eine Vorbehandlung der Zellen mit biologischen oder chemischen Agenzien ist besonders in den Fällen sinnvoll, in denen durch eine einmalige Beanspruchung keine zufriedenstellenden Aufschlussgrade erzielt werden können.

2.1.6.4 Zellaufschluss mittels Rührwerkskugelmühlen

Die Rührwerkskugelmühle besteht aus einem zumeist zylindrischen, horizontal angebrachten, kühlbaren Mahlbehälter, in den ein durch einen Elektromotor angetriebenes Rührwerk hineinragt (Abb. 8).

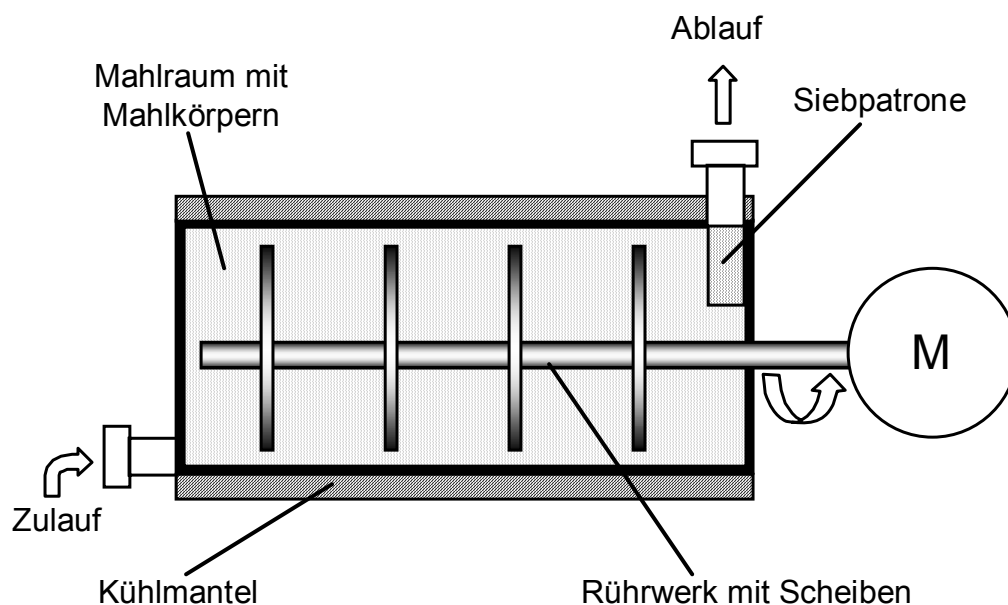


Abb. 8: Schematischer Aufbau einer Rührwerkskugelmühle

Das Rührwerk kann sowohl aus Stiften als auch aus Scheiben verschiedenster Geometrien bestehen. Der Mahlraum ist zu 80 bis 90% mit Mahlkugeln gefüllt, die durch das Rührwerk in Bewegung gesetzt werden und durch Druck- und Scherkräfte die Zellen beanspruchen. Bei kontinuierlichem Betrieb wird die Zellsuspension über den Zulauf durch die Mühle gepumpt. Eine Siebpatrone oder ein Spalt am Ablauf verhindern das Austragen der Mahlkörper.

Der spezifische Energieeintrag in die Rührwerkskugelmühle

Die in eine Rührwerkskugelmühle eingetragene spezifische Energie berechnet sich wie folgt:

$$E_{\text{spez}} = \frac{(M - M_0) \cdot 2\pi \cdot v \cdot t}{V_{\text{Susp}} \cdot c_{\text{BTM}}} \quad \text{Gleichung 8}$$

Sie ist ein Maß für die in den Mahlraum eingebrachte Energie. Obwohl nur ein Teil der Energie auf das Mahlgut übertragen wird (ein anderer Teil dissipiert aufgrund nicht zerkleinerungsrelevanter Reibungsvorgänge und Mahlkörperkontakte), kann sie als relevanter Parameter zur Vorhersage des Zerkleinerungsergebnisses dienen. Versuche haben ergeben, dass das Zerkleinerungsergebnis maßgeblich von der spezifischen Energie abhängt [Stehr, 1982; Weit, 1987]. Bei der Betrachtung dieses Zusammenhangs muss zwischen der Zerkleinerung anorganischer Partikel und dem Zellaufschluss unterschieden werden. Während bei der Zerkleinerung anorganischer Partikel eine Erhöhung der Beanspruchungsenergie zu einer kleineren mittleren Partikelgröße und somit zu einer messbaren Verbesserung des Zerkleinerungsergebnisses führt, ist es für die Bestimmung des Aufschlussgrads unerheblich, ob die Zellhülle nur aufgebrochen oder stark zerkleinert wird [Bunge, 1991].

Zusammenhang zwischen spezifischer Energie, Beanspruchungsenergie und Beanspruchungszahl in der Rührwerkskugelmühle

Das Zerkleinerungsverhalten von Rührwerkskugelmühlen kann im Wesentlichen durch die Parameter spezifische Energie (E_{spez}), Beanspruchungszahl (BZ) und Beanspruchungsenergie (BE) beschrieben werden.

Die Beanspruchungszahl ist die absolute Anzahl von Beanspruchungsvorgängen. Unter Beanspruchungsenergie wird der Teil der spezifischen Energie verstanden, der bei einem einzelnen Beanspruchungsvorgang auf ein Mahlgutpartikel übertragen wird. Das Produkt aus Beanspruchungszahl und Beanspruchungsenergie ist proportional der spezifischen Energie [Kwade, 1996].

$$BZ \cdot BE \propto E_{\text{spez}} \quad \text{Gleichung 9}$$

Zur Reproduktion von Zerkleinerungsergebnissen reicht es also aus, wenn zwei der drei Parameter konstant sind. Die Beanspruchungsenergie, die auf ein Partikel wirkt, ist in verschiedenen Zonen der Mühle unterschiedlich. So werden Mahlkörper, die sich nahe des Außenbereichs der Rührscheibe befinden, deutlich stärker beschleunigt als Mahlkörper nahe der Welle. Daher wird in theoretischen Berechnungen die

Theoretische Grundlagen

Beanspruchungsenergie durch Verteilungen beschrieben [Stender, 2002]. Für die maximale auf das Mahlgut (MG) wirkende Beanspruchungsenergie wurde die von Kwade [Kwade, 1996] aufgestellte Gleichung von Becker [Becker, 1999] um einen Term erweitert, um den Elastizitätsmodul der Mahlkörper sowie den des Mahlguts zu berücksichtigen.

$$BE_{MG} = d_{MK}^3 \cdot \rho_{MK} \cdot v_t^2 \cdot \left(\frac{El_{MK}}{El_{MG} + El_{MK}} \right) \quad \text{Gleichung 10}$$

Das zerkleinerungsaktive Volumen

Um eine Zelle zu beanspruchen, muss sie zwischen zwei Mahlkörpern bzw. einem Mahlkörper und der Wand eingefangen werden (Abb. 9). Je größer der Unterschied zwischen der Größe des Mahlkörpers und dem zu zerkleinernden Partikel, desto geringer ist auch die Summe der zerkleinerungsaktiven Volumina in der Mühle. Bei Berücksichtigung der elastischen Verformung der Zellen wird es effektiv noch geringer.

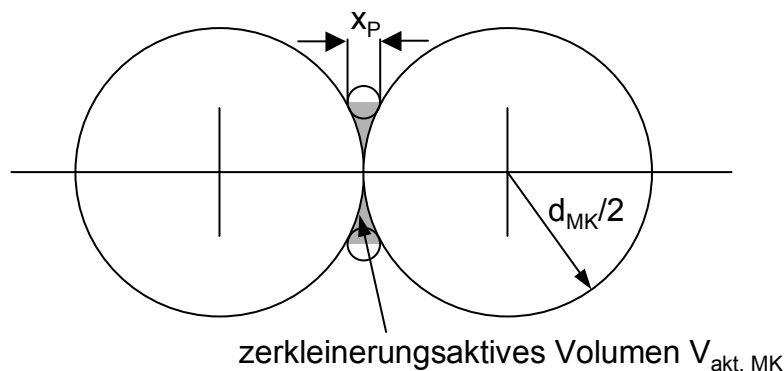


Abb. 9: Zerkleinerungsaktives Volumen zwischen zwei Mahlkörpern

Das zerkleinerungsaktive Volumen zwischen zwei Mahlkörpern berechnet sich wie folgt:

$$V_{akt, MK} = \pi \cdot \frac{x_P^2}{4} \cdot \left(d_{MK} + \frac{4}{3} x_P \right) \quad \text{Gleichung 11}$$

Werden die zerkleinerungsaktiven Volumina der Mühle, die in dieser Arbeit zum Zellaufschluss von *Bacillus megaterium* verwandt wurde, summiert (Mahlräumvolumen: 3826 ml, Füllgrad 80%, $d_{MK} = 700 \mu m$, $d_P = 5 \mu m$), so ergibt sich knapp ein halber Milliliter. Bei kleineren Mahlkörpern vergrößert sich das Volumen ($d_{MK} = 200 \mu m$ führt zu $V_{akt} = 5,3 \text{ ml}$).

Zusammenhang zwischen Mahlkörpergröße und Aufschlussgrad

Bei der Untersuchung unterschiedlicher Mahlkörpergrößen stellte Bunge [Bunge, 1991] für den Zellaufschluss von Hefe eine deutliche Optimumskurve fest (Abb. 10). Trotz gleicher eingetragener spezifischer Energie war der Aufschlussgrad für Mahlkörper von $750 \mu m$ Größe deutlich höher als für größere oder kleinere Mahlkörper.

Diese Beobachtung lässt sich durch die Betrachtung der Beanspruchungszahl und der Beanspruchungsenergie erklären. Nach Gleichung 10 steigt die Beanspruchungsenergie kubisch mit dem Mahlkörperdurchmesser. Eine höhere Beanspruchungsenergie steigert die Bruchwahrscheinlichkeit und wirkt sich daher positiv auf das Zerkleinerungsergebnis aus. Aufgrund der Voraussetzung eines konstanten spezifischen Energieeintrags bedeutet aber eine Steigerung der Beanspruchungsenergie eine Senkung der Beanspruchungszahl (siehe Gleichung 9) was sich wiederum negativ auf das Aufschlussergebnis auswirkt. Diese beiden gegenläufigen Effekte führen zu einer Kurve mit breitem Optimum.

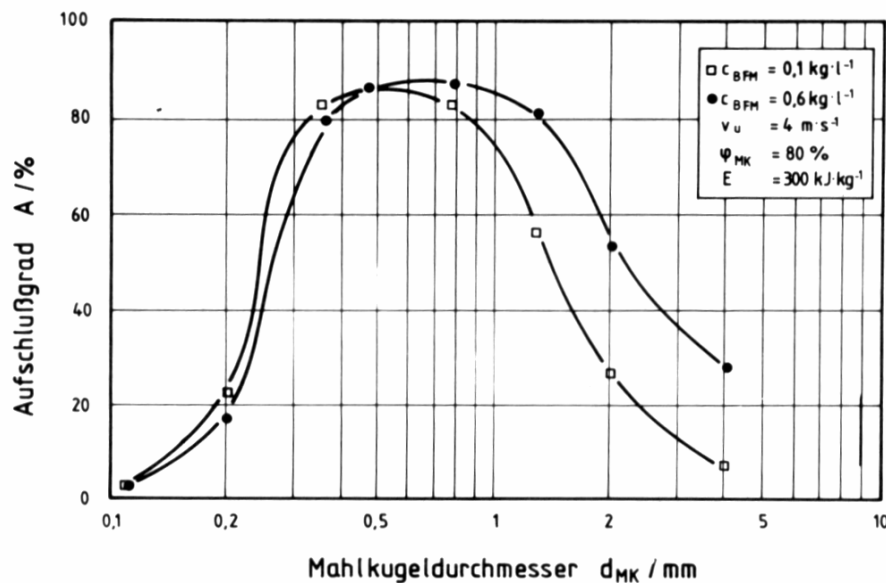


Abb. 10: Aufschlussgrad als Funktion des Mahlkugeldurchmessers bei konstanter spezifischer Energie [Bunge, 1991]

Ferner wird die Kurve durch die Bruchwahrscheinlichkeit der Zellen beeinflusst. Ist die Beanspruchungsenergie zu gering, werden die Zellen lediglich elastisch verformt, und die Energie dissipiert, ohne das Zerkleinerungsergebnis zu verbessern. Ist die Beanspruchungsenergie zu hoch, so stoßen die Mahlkörper mit deutlich mehr Kraft zusammen, als für den Zellaufschluss notwendig ist. Die überschüssige Energie führt zu einer weiterführenden Zerkleinerung der Zelltrümmer, die aber für den Aufschlussgrad irrelevant ist.

Einfluss der Rührscheibenumfangsgeschwindigkeit

Die Rührscheibenumfangsgeschwindigkeit wird auf den äußeren Radius der Rührscheiben bezogen und berechnet sich wie folgt:

$$v_t = \omega \cdot r_{RS} = 2\pi \cdot n \cdot r_{RS}$$

Gleichung 12

Eine Veränderung der Drehzahl wirkt sich auf die kinetische Energie und somit auf die Beanspruchungsenergie aus. Die Änderung der Beanspruchungsenergie lässt sich allerdings nicht in dem Maße beeinflussen, wie es mit der Mahlkugelgröße möglich ist, da die Beanspruchungsenergie kubisch vom Durchmesser, aber nur quadra-

Theoretische Grundlagen

tisch von der Geschwindigkeit abhängt (Gleichung 10). Bei Voraussetzung eines konstanten spezifischen Energieeintrags muss bei einer Erhöhung der Drehzahl die Beanspruchungszahl sinken. Da durch die Erhöhung der Drehzahl auch die Anzahl der Beanspruchungsvorgänge pro Zeiteinheit zunimmt, ist dies nur durch eine Verkürzung der Versuchsdauer möglich. Die Wirkung der Veränderung von Beanspruchungszahl und Beanspruchungsenergie wurde bereits im Kapitel zum Einfluss der Mahlkörpergröße diskutiert.

Die Auswirkung einer Änderung der Rührscheibenumfangsgeschwindigkeit ist abhängig vom Arbeitspunkt des Systems. Liegt die Beanspruchungsenergie im optimalen Bereich (in Abb. 10 entspräche das dem Bereich um $d_{MK} = 500 \mu m$ herum), so sind die Unterschiede nur gering. Außerhalb des Optimums (z.B. im Bereich von $d_{MK} = 2000 \mu m$) sind deutliche Unterschiede im Aufschlussgrad zu verzeichnen [Bunge, 1991].

Einfluss der Biomassekonzentration beim Zellaufschluss in der Rührwerkskugelmühle

Eine Erhöhung der Biomassekonzentration hat zwei Effekte. Zum einen erhöht sich die Wahrscheinlichkeit, dass bei einem Mahlkörperzusammenstoß mehrere Partikel eingefangen werden [Mende, 2004], zum anderen wird die Viskosität der Suspension erhöht, so dass die Mahlkörper stärker abgebremst werden. Generell gilt aber, dass hohe Biotrockenmassekonzentrationen vorteilhaft sind, da die eingebrachte Energie besser ausgenutzt wird.

Einfluss des Mahlkörperfüllgrads

Der Mahlkörperfüllgrad (φ_{MK}) ist definiert als das Verhältnis des Schüttvolumens der ruhenden Mahlkörperschüttung zum Volumen des Mahlraums:

$$\varphi_{MK} = \frac{V_{\text{Mahlkörperschüttung}}}{V_{\text{Mahlraum}}}$$

Gleichung 13

Messungen des Hohlraumanteils der ruhenden Mahlkörperschüttung aus Hartglasperlen ergaben im Mittel $\varepsilon = 0,41$ [Bunge, 1991]. Er ist unabhängig vom Mahlkugeldurchmesser. Generell gilt, dass mit steigendem Füllgrad auch der Aufschlussgrad steigt. Im bewegten Zustand dehnt sich die Packung jedoch aus, daher führt ein zu hoher Mahlkörperfüllgrad zu Verpressungen in der Mühle. Ein Wert von $\varphi = 0,85$ bis $\varphi = 0,9$ hat sich durch zahlreiche Versuche als optimal erwiesen. Bei zu geringem Mahlkörperfüllgrad beobachtete Bunge durch einen gläsernen Mahlraumzylinder Entmischungerscheinungen in der kontinuierlich betriebenen Mühle. Alle Mahlkörper sammelten sich in einer Hälfte des Mahlraums vor der Mahlkörperabtrennung, während die andere Hälfte leer war. Dies führte zu einer deutlichen Verschlechterung der Aufschlussergebnisse [Bunge, 1991].

Aufschlusskinetik in der Rührwerkskugelmühle

Generell sollte der Zellaufschluss nicht länger als notwendig durchgeführt werden, da die eingetragene Energie nahezu vollständig in Wärme dissipiert und so bei unzureichender Kühlung die Suspension bis zu einem Punkt erwärmt werden kann, an dem thermolabile Proteine denaturieren. Ferner können Proteine durch mechanische Beanspruchung ihre Funktion verlieren.

Die Kinetik des Zellaufschlusses in Rührwerkskugelmühlen wird in der Regel mit einer Reaktion erster Ordnung beschrieben [Kula und Schütte, 1987; Bunge, 1991; Pittroff, 1993]:

$$\ln\left(\frac{100}{100-A}\right) = k \cdot t \quad \text{Gleichung 14}$$

Für kontinuierliche Rührwerkskugelmühlen kann die Aufschlusskinetik als eine Serie von vollständig durchmischten Mühlen beschrieben werden [Middelberg, 1998].

$$\frac{100}{100-A} = \left(1 + \frac{k\tau}{j}\right)^j \quad \text{Gleichung 15}$$

2.1.6.5 Zellaufschluss mittels Ultraschallhomogenisator

Neben dem Zellaufschluss wird der Ultraschallhomogenisator auch zur Desagglomeration, Homogenisierung, Emulgierung und zur Oberflächenreinigung eingesetzt. Die Geräte bestehen im wesentlichen aus drei Komponenten: Einem Generator, der hochfrequente Spannung im Bereich von 15 bis 40 kHz bereitstellt, einem Keramik-kristall aus piezoelektrischem Material, der die elektrischen Impulse in mechanische Schwingungen umwandelt, und der Sonotrode, die diese Schwingungen an das Medium überträgt (Abb. 11).

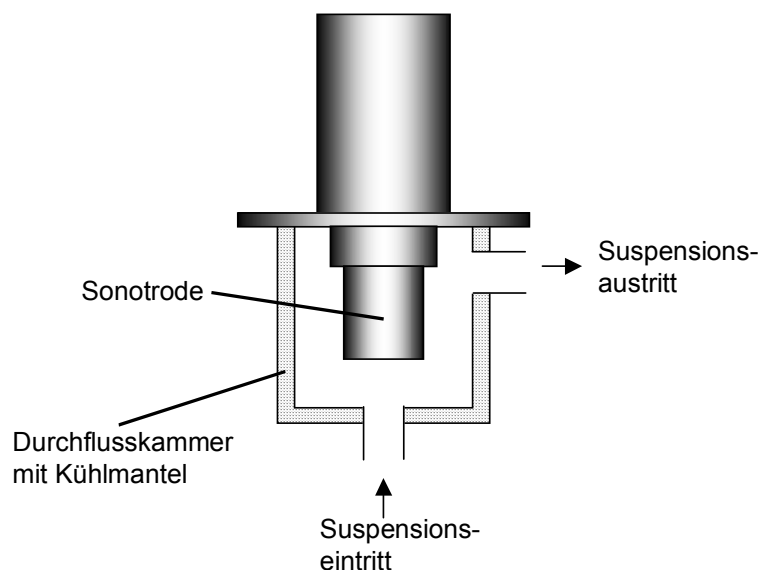


Abb. 11: Schema eines Ultraschallhomogenisators

Theoretische Grundlagen

Die heutigen Modelle reichen zur Beschallung von einem halben Milliliter Suspension bis zu Geräten, die im Durchfluss mittels hintereinander geschalteter Sonotroden mehrere hundert Liter pro Stunde beanspruchen. Ein großes Einsatzgebiet des mechanischen Zellaufschlusses mittels Ultraschall ist die Abwasserreinigung. Hier kann Ultraschall zur Verbesserung der Absetzeigenschaften von Blähschlämmen und Schwimmschlämmen eingesetzt werden. Durch die Ultraschallwellen werden große Flocken desagglomeriert und eingeschlossene Gasbläschen, die zum Aufschwimmen des Schlammes geführt haben, freigesetzt [Müller, 1996a; Lehne, 2001]. Auch der Einsatz zur Klärschlammintegration vor der Faulung bzw. vor der Rückführung als Rücklaufschlamm ist bereits mit Hilfe einer Pilotanlage untersucht worden [Nickel et al., 1998].

Der spezifische Energieeintrag bei der Ultraschallhomogenisation

Der spezifische Energieeintrag des Ultraschallhomogenisators berechnet sich nach folgender Formel:

$$E_{\text{spez}} = \frac{P \cdot t}{V_{\text{Susp}} \cdot c_{\text{BTM}}}$$

Gleichung 16

Das Aufschlussprinzip des Ultraschallhomogenisators

Die mechanischen Schwingungen des Ultraschallhomogenisators werden auf das Medium übertragen. Diese Schwingungen führen zu Kavitationserscheinungen im Bereich weniger Millimeter vor der Sonotrode [Müller, 1996a]. Das Medium kann der Schwingung der Sonotrode aufgrund seiner Trägheit nicht folgen, so dass die Flüssigkeit aufreißt und sich ein Vakuum bildet, das sofort aufgrund des Dampfdrucks der Flüssigkeit mit Dampf gefüllt wird. Der Mikroprozess des Aufschlussvorgangs durch Kavitation wurde bereits auf Seite 11 diskutiert. Eine hohe Viskosität oder ein erhöhter Druck wirken sich negativ auf die Effizienz des Aufschlusses aus. Der Grund dafür liegt in der verminderten Kavitation. Daher führt der Gehalt an Biomasse ab einer Konzentration von über 40% zu einer deutlich verschlechterten Effizienz des Aufschlusses. Auch große Mengen an gelöstem Kohlendioxid können zu einer Reduzierung des Aufschlussersfolgs führen, da das Gas in die Kavitationsblasen diffundiert und somit deren Innendruck erhöht. Der Kollaps der Kavitationsblasen verläuft dadurch deutlich schwächer. Dieses Phänomen kann bei Mikroorganismen, die Kohlenstoffquellen im erhöhten Ausmaß oxidieren, die Ursache für einen verminderten Aufschlussgrad durch Ultraschall sein. Zur Erhöhung der Anzahl der Kavitationsergebnisse können der Suspension zusätzliche Kavitationskeime in Form von Glasmehl hinzugegeben werden. Für Hefe konnte mit dieser Methode eine deutliche Steigerung des Aufschlussgrades festgestellt werden [Hughes et al., 1971].

Neis und Tiehm untersuchten die Abhängigkeit des Aufschlussgrades von der Frequenz im Bereich von 41 kHz bis 3217 kHz. Es zeigte sich, dass bei den kleinsten Frequenzen die größten Aufschlussgrade erreicht werden konnten [Neis und Thiem, 1999].

Eine Erhöhung der Amplitude des Ultraschallsignals führt zu einer deutlichen Beschleunigung des Zellaufschlusses. Allerdings ist dabei zu beachten, dass durch den höheren Energieeintrag auch die Temperatur der Suspension schneller ansteigt. Ferner nimmt die Menge der gebildeten Radikale deutlich zu [Hughes et al., 1971]. Daher ist die Zugabe von Radikalfängern wie Gluthation empfehlenswert.

2.1.6.6 Weitere Geräte für den mechanischen Zellaufschluss

Schwingmühlen sind geeignet für die Nass- und Trockenmahlung spröder Materialien aller Härtegrade und finden daher in vielen Bereichen Anwendung. Sie bestehen im Wesentlichen aus einem zylindrischen Mahlraum, der durch einen Exzenterantrieb in Schwingungen versetzt werden kann. Die Schwingfrequenzen liegen zwischen 100 und 6000 Schwingungen pro Minute [Schwedes und Bunge, 1990]. Die Mahlraumvolumina von Apparaten, die zum Zellaufschluss eingesetzt werden, liegen zumeist zwischen wenigen Millilitern und einem Liter. Die Zerkleinerung des Mahlgutes basiert auf der Beanspruchung durch die im Mahlraum enthaltenen Mahlkörper. Durch die Schwingungen werden diese in Bewegung versetzt und beanspruchen das Mahlgut durch Druck und Scherung. Das Mahlgut wird entweder zusammen mit den Mahlkörpern in den Mahlraum eingefüllt (diskontinuierlich) oder kontinuierlich durch angeschlossene Schläuche durch die Mühle gepumpt. Dabei werden die Mahlkörper durch ein Sieb im Mahlraum zurückgehalten. Für den Zellaufschluss haben sich Mahlkörper mit einem Durchmesser zwischen 200 µm und 1 mm bewährt. Aufgrund ihrer einfachen Bauweise werden Schwingmühlen auch zur kryogenen Mahlung genutzt. Im Kunststoffbereich werden die Materialien durch die tiefe Temperatur spröde und lassen sich besser aufschließen. Im biologischen Bereich wird die DNA und RNA Extraktion in Anwesenheit von flüssigem Stickstoff durchgeführt, um einen Abbau der Nucleinsäuren zu verhindern [Retsch, 2004].

Die **French Press** wurde erstmals 1950 von Milner, Lawrence und French als diskontinuierlich zu betreibendes Zellaufschlussgerät vorgestellt [Milner et al., 1950]. Es besteht aus einem druckfesten Zylinder mit einem zur Zylinderwand abgedichteten Kolben. Am Grund des Zylinders befindet sich ein Auslass mit geringem Durchmesser, der durch ein Reduzierorgan verengt bzw. verschlossen werden kann. Zum Betrieb wird die Zellsuspension in den vorgekühlten Zylinder gegeben und der Auslass wird verschlossen. Mit Hilfe des Stempels wird anschließend blasenfrei ein Druck von bis zu 2000 bar auf die Suspension ausgeübt. Anschließend wird das Ventil soweit geöffnet, dass die Suspension mit geringem Volumenstrom aus dem Zylinder entweichen kann. Beim Durchfluss durch das Reduzierorgan wird die Suspension sehr stark beschleunigt. Der Aufschlussmechanismus ist also dem des Hochdruckhomogenisators sehr ähnlich. Aufgrund ihres kleinen Volumens (ca. 50 ml) findet die French Press lediglich in Laboratorien Anwendung.

Theoretische Grundlagen

Die 1951 von Hughes et al. erstmals beschriebene **Hughes Press** besteht ebenfalls aus einem druckfesten Zylinder mit einem Kolben [Hughes et al., 1971]. Im Gegensatz zur French Press liegt hier aber die hochkonzentrierte Suspension im gefrorenen Zustand vor. Durch sehr hohen Druck (bis zu 5000 bar) wird die gefrorene Suspension durch einen engen Spalt am Zylinderboden gepresst. Die Zerkleinerungswirkung ist auf hohe Schubspannungen sowie auf die abrasive Wirkung der Eiskristalle zurückzuführen. Die Hughes Press erfuhr mehrere Modifikationen. So wurde sie z.B. 1960 von Edebo [Edebo, 1969] zur **X-Press** modifiziert, in der die gefrorene Suspension zwischen zwei Kammern hin und her gepresst werden konnte.

Die **Chaikoff Press** wurde 1957 von Emanuell und Chaikoff zur Gewinnung intakter Zellkerne aus tierischem Gewebe entwickelt [Hughes et al., 1971]. Sie besteht aus einem Zylinder und einem Kolben, der im Unterschied zur French Press nicht zur Wand abgedichtet ist, sondern einige Mikrometer kleiner als die Zylinderbohrung ist. Nach dem Einfüllen der Suspension in den Zylinder wird der Kolben abgesenkt und die Zellsuspension fließt durch den Spalt entgegen der Kolbenrichtung. Dabei werden selten höhere Drücke als 200 bar erreicht. Die Spaltweite kann durch den Einsatz verschiedener Kolben je nach Feststoffgehalt der Suspension zwischen 6 µm und 130 µm variiert werden.

Prallstrahlapparaturen bestehen im Wesentlichen aus einer Hochdruckkolbenpumpe, einem Ventil und einer Prallplatte. Bei hohen Drücken (bis 1200 bar) wird die Suspension durch das Ventil gepumpt. Die stark beschleunigte Suspension prallt nun auf die dahinterliegende Prallplatte [Choi et al., 1997]. Eine weitere Modifikation ist die **Autogenstrahlmühle**. Bei ihr werden zwei identische Teilströme aufeinander zugeführt und prallen so mit der doppelten Geschwindigkeit aufeinander.

2.2 Die Expanded Bed Chromatographie

Bei der Reinigung intrazellulärer Produkte steht nach dem Zellaufschluss das Problem der Primärseparation (Trennung von Biomasse und Zielprotein) an. Bislang etablierte Verfahren sind die Zentrifugation und die Mikrofiltration [Hjorth et al., 1998]. Die langen Prozesszeiten bei diesen verfahrenstechnischen Schritten bergen die Gefahr der Produktdestabilisierung, ausgelöst durch Proteasen oder Milieubedingungen. Produktverluste entstehen bei der Filtration auch durch Retention an der Deckschicht sowie durch Totvolumina und unspezifische Adsorption. Weitere, allerdings in der Industrie nicht sehr weit verbreitete Verfahren sind die Extraktion sowie die Magnetseparation.

Seit etwa 15 Jahren gewinnt die Expanded Bed Adsorption zunehmend an Bedeutung [Chase, 1994; Chang und Chase, 1996; Thömmes, 1997; Anspach et al., 1999]. und wird inzwischen auch in der Industrie als Verfahren zur Proteinreinigung genutzt. Bei dieser Methode werden Adsorberpartikel, die die Möglichkeit haben, den gewünschten Wertstoff zu binden, in einer Säule fluidisiert und mit aufgeschlossener Zellsuspension beschickt. Das Zielprodukt bleibt bei dieser Methode an den Adsorberpartikeln hängen, während die Zelltrümmer die Säule durch das obere Ende verlassen. In einem zweiten Schritt, der Elution, wird das Produkt von den Adsorberpartikeln abgelöst und in einer separaten Fraktion aufgefangen. Mit einer geschickten Wahl des Adsorbermaterials kann so die Zelltrümmerabtrennung mit einer ersten, chromatographischen Reinigung verbunden werden (Abb. 12). Als Adsorberpartikel werden zumeist Ionenaustauscher auf Agarosebasis verwandt, deren Sinkgeschwindigkeit durch einen Quarzkern erhöht wird. Im Unterschied zur üblichen Fließbettadsorption werden im Expanded Bed Partikel unterschiedlicher Größe oder Dichte eingesetzt. Bevor die Säule mit Zelltrümmersuspension beschickt wird, werden die Partikel mit Puffer fluidisiert, so dass sie sich ihrer Größe oder Dichte nach anordnen (die größeren/schwereren unten und die kleineren/leichteren oben). Dadurch gewinnt das Bett an Stabilität und weist deutlich schmalere Verweilzeitverteilungen auf, als es in einer Wirbelschicht der Fall ist. Die Folge ist eine gleichmäßigere Proteinadsorption sowie eine Reduzierung der Volumina, die zum Waschen bzw. zur Elution benötigt werden. Untersuchungen haben gezeigt, dass Zelltrümmer ebenfalls an den Adsorberpartikeln adsorbieren und so einen negativen Einfluss auf die Verweilzeitverteilung und die Stabilität des Expanded Beds sowie auf die Adsorptionskapazität der verwendeten festen Phase ausüben [Fernandez-Lahore et al., 1999].

Theoretische Grundlagen

Typische Vorgehensweise bei der Reinigung intrazellulärer Produkte

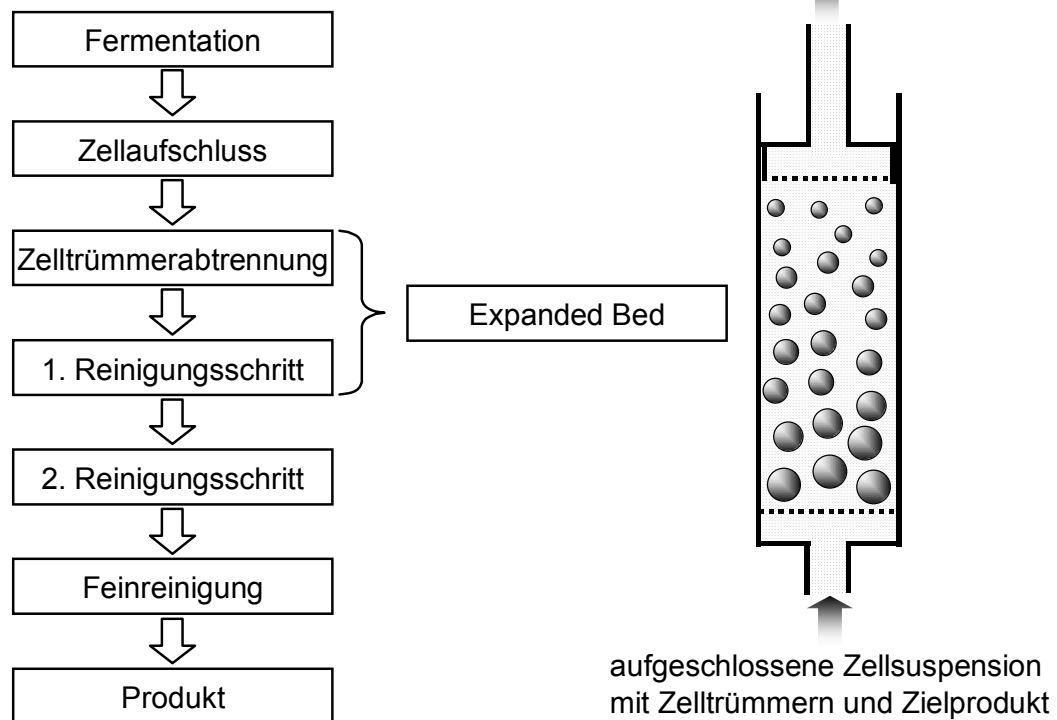


Abb. 12: Vorteile der Expanded Bed Chromatographie gegenüber herkömmlichen Aufreinigungsstrategien

2.2.1 Adsorbermaterial

An das Adsorbermaterial werden hohe Anforderungen gestellt. Zum einen muss es eine hohe Sinkgeschwindigkeit aufweisen, damit die Verweilzeit der fluiden Phase nicht zu groß wird. Zum anderen dürfen die Partikel nicht zu groß werden, da die zu adsorbierenden Stoffe sonst zu lange brauchen, um in das Partikel zu diffundieren. Für die Stabilität des Betts ist ferner eine breite Größen- oder Dichteverteilung der Adsorberpartikel notwendig. Eine weitere Anforderung ist die Porengröße der Adsorberpartikel, da Proteine vergleichsweise große Moleküle sind. Die harschen Reinigungsbedingungen (siehe auch Kapitel 3.4.3.3, S. 68) setzen außerdem noch eine gute chemische Beständigkeit gegenüber Laugen, Säuren und Alkoholen voraus.

Bei den am weitesten verbreiteten Materialien handelt es sich um die kommerziellen Adsorberpartikel der Reihe STREAMLINE der Firma Amersham Biosciences (GE Healthcare). Die Partikel haben eine Größe von 100 µm bis 300 µm und bestehen aus 6% Agarose, deren Dichte durch einen Quarzkern auf 1,15 g/ml erhöht wird. Übliche Strömungsgeschwindigkeiten liegen zwischen 200 cm/h und 500 cm/h.

In der Literatur lassen sich mehrere Artikel finden, in denen deutlich kleinere, aber auch schwerere Partikel auf ihre Tauglichkeit für Expanded Bed Anwendungen untersucht wurden.

Theoretische Grundlagen

Mullick und Flickinger [Mullick und Flickinger, 1999] untersuchten 38 µm bis 75 µm große Adsorberpartikel aus Fluorit modifiziertem, porösen Zirkoniumoxid ($\varphi = 2,8 \text{ g/ml}$). Diese erwiesen sich beim Einsatz von hohen Biotrockenmassenkonzentrationen ($>100 \text{ g/l}$) als geeignetere Adsorbermaterialien als die STREAMLINE Partikel.

Adsorberpartikel aus makroporöser, quervernetzter Cellulose wurden von Pai et al. untersucht [Pai et al., 1999]. Diese Partikel haben eine Größe zwischen 150 µm und 200 µm und zeigen aufgrund ihrer hohen Dichte eine geringere Bettexpansion als die STREAMLINE Partikel.

Theodossiou et al. [Theodossiou et al., 2002] untersuchten Stahlkugeln, die mit Agarose ummantelt wurden (20 µm bis 50 µm Durchmesser, $\rho = 3,9 \text{ bis } 4,7 \text{ g/ml}$). Es wurde eine deutliche Abweichung des Expansionsverhaltens von der Korrelation nach Richardson und Zaki (Gleichung 21, S. 30) festgestellt.

Tong et al. untersuchten die hydrodynamischen Eigenschaften sowie die Aufreinigung von Lysozym an Agarosepartikeln, deren Dichte mit einer Legierung aus Neodymium, Eisen und Bor (Nd-Fe-B) erhöht wurde [Tong et al., 2002; Tong und Sun, 2002a]. Neben der normalen Klassierung durch Größen und Dichteunterschiede können diese Partikel zusätzlich magnetisch stabilisiert werden.

Ferner wurde von Tong und Sun ein Vergleich zwischen Größen- und Dichteverteilung vorgenommen [Tong und Sun, 2002b]. Sie verglichen STREAMLINE Partikel, die eine relativ gleichmäßige Dichte haben, mit Agarosepartikel der Firma UpFront, die durch einen Stahlkern in verschiedenen Größen eine breite Dichteverteilung (1,6 g/ml bis 3 g/ml, Durchmesser 60 µm bis 250 µm) besitzen. Es zeigte sich, dass sich die STREAMLINE Partikel in der Säule der Größe nach ordneten, während sich die UpFront Partikel unabhängig von der Größe nur nach der Dichte ordneten. Dies ist ein sehr überraschendes Ergebnis, denn die Sinkgeschwindigkeiten (Tab. 2) nach der Stokes'schen Gleichung (Gleichung 20) ergeben für die großen, leichten Partikel (letzte Spalte) eine deutlich höhere Sinkgeschwindigkeit als für kleine schwere (vorletzte Spalte).

Tab. 2: Sinkgeschwindigkeiten nach Stokes (Gleichung 20) für verschiedene Adsorberpartikel

	Streamline	Streamline	UpFront	UpFront	UpFront
Dichte (g/ml)	1,15	1,15	1,6	4	1,6
Durchmesser (µm)	100	300	60	60	250
Viskosität (mPa·s)	1	1	1	1	1
Sinkgeschwindigkeit (cm/h)	29,4	264,9	42,4	211,9	735,8

Die Partikel sind in der Regel mit starken oder schwachen Ionenaustauschern oder mit Affinitätssorbentien derivatisiert. Auch Partikel für die Metallchelatchromatographie gehören heute zu den Standardprodukten.

Theoretische Grundlagen

Da das Expanded Bed mit ungereinigter Zellbrühe beaufschlagt wird, eignen sich Affinitäts- oder Metallchelatchromatographiesorbentien besonders gut, da sie nur geringe unspezifische Wechselwirkungen mit den Zelltrümmern aufweisen.

2.2.2 Expansionsverhalten

Die Ausdehnung der Schüttung des Adsorbermaterials ist von vielen Faktoren abhängig. Neben der Dichte und der Größe der Adsorberpartikel spielen auch die Dichte, die Viskosität und die Strömungsgeschwindigkeit des Mediums eine Rolle. Um eine partikelbeladene Suspension durch das Expanded Bed zu pumpen, muss die Schüttung expandiert sein. Dadurch ergibt sich eine minimale Strömungsgeschwindigkeit, die oberhalb der Fluidisationsgeschwindigkeit liegt. Bei dieser Geschwindigkeit ist die durch den Druckabfall Δp bedingte Druckkraft auf die Schüttung gleich der Gewichtskraft des Adsorbers abzüglich der Auftriebskraft durch das Fluid.

$$\Delta p = (1 - \varepsilon) \cdot (\rho_p - \rho_l) \cdot g \cdot h \quad \text{Gleichung 17}$$

Die Fluidisationsgeschwindigkeit kann bei einer monodispersen Schüttung genauer bestimmt werden als bei einer Schüttung mit breiter Partikelgrößenverteilung. Bei weiterer Erhöhung der Strömungsgeschwindigkeit expandiert das Bett bei gleichbleibendem Druckabfall über der Schüttung bis zu dem Punkt, an dem das Adsorbens hydraulisch gefördert wird. An diesem Punkt steht die Strömungsgeschwindigkeit mit der Sinkgeschwindigkeit der Partikel im Gleichgewicht bzw. die Gewichtskraft eines Partikels abzüglich der Auftriebskraft entspricht der Widerstandskraft durch die Partikelumströmung.

$$\frac{\pi}{6} \cdot d_p^3 \cdot g \cdot (\rho_p - \rho_l) = \xi(Re_t) \cdot \frac{\pi}{4} \cdot d_p^2 \cdot \frac{\rho_l}{2} \cdot u_t^2 \quad \text{Gleichung 18}$$

Sollte die Schüttung soweit expandiert sein, dass der Feststoffgehalt unter 0,2% liegt, kann, unter Annahme laminarer Strömung, der Widerstandsbeiwert ξ durch folgende Gleichung angegeben werden:

$$\xi = \frac{24}{Re_t} \quad \text{Gleichung 19}$$

So dass sich für Gleichung 18 das Stoke'sche Gesetz ergibt:

$$u_t = \frac{(\rho_p - \rho_l) \cdot d_p^2 \cdot g}{18\eta} \quad \text{Gleichung 20}$$

Bei einem höheren Feststoffgehalt, wie er bei der Expanded Bed Chromatographie in der Regel vorliegt, kann die Sinkgeschwindigkeit mit der Korrelation von Richardson und Zaki [Richardson und Zaki, 1997] (Reprint von 1954) ausreichend gut beschrieben werden:

$$\frac{u_{ss}}{u_t} = \varepsilon^n \quad \text{Gleichung 21}$$

Diese Gleichung ist nur für kleine Partikel- zu Säulendurchmesserverhältnisse gültig. Für Verhältnisse $d_p/d_c > 0,01$ muss mit Wandeffekten gerechnet werden. Für übliche Anwendungen im Expanded Bed ist für n ein Wert von 4,65 angegeben.

Zwei weitere bekannte Gleichungen zur Beschreibung der Schwarmsinkgeschwindigkeit (entspricht u_0) sind die von Brauer (Gleichung 22) und Happel (Gleichung 23).

$$\frac{u_0}{u_t} = \frac{\varepsilon}{\left(1 + \frac{1-\varepsilon}{\varepsilon^2}\right) \left(1 + \frac{1,2}{\left(1 + (\pi/(12(1-\varepsilon)))^2\right)^{1/2}} - 1/2\right)} \quad \text{Gleichung 22}$$

$$\frac{u_0}{u_t} = \frac{3 - 4,5(1-\varepsilon)^{1/3} + 4,5(1-\varepsilon)^{5/3} - 3(1-\varepsilon)^2}{3 + 2(1-\varepsilon)^{5/3}} \quad \text{Gleichung 23}$$

Die sedimentierte Schüttung hat eine Porosität ε_0 und eine Höhe h_0 . Bei der Bettexpansion nimmt die Höhe h bei entsprechender Abnahme der Porosität ε , nach folgender Gleichung zu.

$$\frac{h}{h_0} = \frac{(1-\varepsilon_0)}{(1-\varepsilon)} \quad \text{Gleichung 24}$$

Die Porosität (ε_0) für das sedimentierte Bett kann aus der Verweilzeit eines Signalstoffes, der nicht in die feste Phase eindringt oder mit dieser interagiert, berechnet werden. Eine Alternative dazu bietet die "Random-Bed-Theorie" ($\varepsilon_0 = 0,418$) [Jakubith, 1991]. Zur Abschätzung wird für die Porosität häufig ein Wert von $\varepsilon_0 = 0,4$ angenommen.

Untersuchungen haben gezeigt, dass höhenabhängig unterschiedlich große Partikeldurchmesser auftreten, wobei die Partikelgrößenverteilungen im unteren Teil der Säule deutlich breiter sind als im oberen Teil der Säule [Willoughby et al., 2000; Bruce und Chase, 2001; Tong und Sun, 2002b]. Es konnte gezeigt werden, dass die Partikel nicht streng nach ihrer Größe geordnet werden. Während im unteren Teil der Säule die Partikelgrößenverteilung nahezu den vollen Bereich abdeckt, sind im oberen Bereich lediglich kleine Partikel zu finden. Diese Ergebnisse konnten reproduziert werden (siehe Kapitel 4.3.2, S. 86). Radiale Profile in der Partikelgrößenverteilung sind nur geringfügig ausgeprägt [Tong und Sun, 2002b].

2.2.3 Verweilzeitverteilung

Die Verweilzeitverteilung spielt eine wichtige Rolle bei der Proteinreinigung im Expanded Bed. Verbleiben die Fluidelemente alle gleich lang in der Säule, so haben alle Proteine auch gleich viel Zeit, um an den Adsorber zu binden. Dies erhöht die Effizienz der Adsorption. Ein weiterer Vorteil liegt darin, dass deutlich weniger Wasch- bzw. Elutionslösung benötigt wird.

Theoretische Grundlagen

Bei der Durchströmung von Packungen kann sich keine laminare Strömung über den Säulenquerschnitt ausbilden, die aufgrund ihrer Geschwindigkeitsverteilung eine Verbreiterung der Verweilzeitverteilung mit sich bringen würde. Stattdessen liegt eine Kolbenströmung vor, die nur geringe Geschwindigkeitsgradienten über den Querschnitt aufweist.

In der Literatur wird die Verweilzeitverteilung häufig mit einer Rührkesselkaskade oder dem Dispersionsmodell beschrieben.

Das einaxiale **Dispersionsmodell** beschreibt die Verweilzeitverteilung eines Stoffes durch das 2. Fick'sche Gesetz, das durch einen konvektiven Transport überlagert wird. Da neben der Diffusion auch Strömungsvorgänge für eine Verbreiterung der Verweilzeitverteilung verantwortlich sind, wird im Term des zweiten Fick'schen Gesetzes der Diffusionskoeffizient durch den axialen Dispersionskoeffizienten ersetzt. Das Modell geht davon aus, dass eine vollständige radiale Vermischung vorliegt.

$$\frac{\partial c}{\partial t} = -u \frac{\partial c}{\partial l} + D_{ax,l} \frac{\partial^2 c}{\partial l^2} \quad \text{Gleichung 25}$$

Zur Normierung von Gleichung 25 werden folgende dimensionslose Ausdrücke eingeführt:

Dimensionslose Konzentration:

$$C = \frac{c}{c_0} \quad \text{Gleichung 26}$$

Dimensionslose Länge:

$$L = \frac{l}{l_0} \quad \text{Gleichung 27}$$

Dimensionslose Zeit (reduzierte Verweilzeit):

$$\Theta = \frac{t}{\tau} = \frac{t \cdot u}{l} = \frac{t \cdot u_0}{l \cdot \varepsilon} \quad \text{Gleichung 28}$$

Bodensteinzahl:

$$Bo = \frac{u_0 \cdot h}{\varepsilon \cdot D_{ax,l}} \quad \text{Gleichung 29}$$

Es ergibt sich die dimensionslose Gleichung für das Dispersionsmodell:

$$\frac{\partial C}{\partial \Theta} = - \frac{\partial C}{\partial L} + \frac{1}{Bo} \cdot \frac{\partial^2 C}{\partial L^2} \quad \text{Gleichung 30}$$

Beim Durchfluss durch einen idealen Rührkessel wird die Bodensteinzahl Null, für ein ideales Strömungsrohr mit Pfropfenströmung wird die Bodensteinzahl unendlich groß. Bei Bodensteinzahlen > 40 unterscheiden sich die Strömungsverhältnisse kaum von denen im gepackten bzw. sedimentierten Bett [Anspach et al., 1999].

Die Lösung der partiellen Differentialgleichung (Gleichung 30) ist von den einzuhaltenden bzw. vorgegebenen Anfangs- und Randbedingungen abhängig. Als Anfangsbedingungen können verschiedene Möglichkeiten zur Aufgabe der Markersubstanz unterschieden werden. Sie kann in Form eines Diracimpulses oder eines Konzentrationssprungs aufgegeben werden. Für die Randbedingungen können drei Fälle unterschieden werden: Beidseitig offener Reaktor (Rückvermischung am Ein- und Austritt), einseitig offener Reaktor und beidseitig geschlossener Reaktor (keine Rückvermischung am Ein- und Austritt). Da in dieser Arbeit die Aufgabe der Markersubstanz sowie dessen Konzentrationsmessung in der Zu- bzw. Ableitung der Säule durchgeführt wurden, wurde von einem beidseitig geschlossenen Reaktor ausgegangen. Die hohen Strömungsgeschwindigkeiten in den Leitungen verhindern eine Rückvermischung.

Das Modell einer **Rührkesselkaskade** kann zwar prinzipiell auch schiefe Kurven nachbilden, jedoch ist die Nachbildung realer Kurven durch nur einen Parameter (der Anzahl Rührkessel) begrenzt. Ham und Platzer stellten deshalb zwei halbempirische Gleichungen zur Verweilzeitverteilung in dispersen Phasen vor, die leicht schiefe Verteilungen deutlich besser abbilden können [Ham und Platzer, 2004].

Eine weitere Methode zur Beschreibung der Strömungsbedingungen ist das PDE-Modell (**P**lug flow with axial **D**ispersion and mass **E**xchange). Wie bei der Chromatographie üblich, beschreibt es eine fluide und eine feste Phase. In der fluiden Phase herrscht nahezu Kolbenströmung mit axialer Rückvermischung, während gleichzeitig ein Austausch mit der festen Phase stattfindet [Fernandez-Lahore et al., 1999].

In der Praxis erfolgt die graphische Darstellung der Verweilzeitverteilung zumeist mit der Verweilzeitdichtefunktion ($E(\Theta)$, Gleichung 31), die über der reduzierten Verweilzeit (Θ , Gleichung 32) aufgetragen wird.

$$E(t) = \frac{\dot{V} \cdot c(t)}{\int_0^{\infty} \dot{V} \cdot c(t) dt} \quad \text{Gleichung 31}$$

$$\Theta = \frac{t}{\tau} = \frac{t \cdot \dot{V}}{V_c} \quad \text{Gleichung 32}$$

Theoretische Grundlagen

2.2.3.1 Einfluss von Zelltrümmern auf die Verweilzeitverteilung

Die Verweilzeitverteilung der fluiden Phase im Expanded Bed wird durch Anwesenheit von Zellen bzw. Zelltrümmern verbreitert [Feuser et al., 1999]. Versuche mit Glycerin zur Erhöhung der Viskosität zeigten, dass die Viskosität nur einen geringen Einfluss auf die Verweilzeit hat [Lin et al., 2003b]. Die Verbreiterung der Verweilzeitverteilung und damit die Senkung der Reinigungsleistung liegt vor allem an Adsorptionsvorgängen von Zellen bzw. Zelltrümmern an den Adsorberpartikeln [Fernandez-Lahore et al., 1999; Fernandez-Lahore et al., 2000]. Sie "verkleben" die Adsorberpartikel untereinander und verändern damit die Partikelgröße. Dieser Vorgang ist insbesondere bei den positiv geladenen Anionenaustauschern ausgeprägt, da die Zellwand ein negatives Potential aufweist. Kationenaustauscher und in noch geringerem Maße Metallchelatchromatographie-Materialien sind dadurch weniger beeinflussbar. Zur Untersuchung der elektrostatischen Wechselwirkungen von Biomasse und Adsorbent wurden Zeta-Potential-Studien durchgeführt [Lin et al., 2003a]. Diese ergaben, dass ein Zeta-Potential der Zellbruchstücke von 0 mV zu den geringsten Interaktionen mit dem Adsorbermaterial führt. Brixius [Brixius, 2003] bestimmte die Interaktionen der Zelltrümmer mit dem Cell Transmission Index (CTI). Dazu werden vor und hinter der Säule photometrische Detektoren angebracht, die Zelltrümmer bei 600 nm detektieren. Anschließend wird eine kleine Menge Zelltrümmersuspension vor der Säule eingespritzt. Die von den Detektoren gemessenen Extinktionen werden über der Zeit integriert und die unterschiedlichen Flächen (die daraus resultieren, dass ein Teil der Zelltrümmer adsorbiert) werden ins Verhältnis gesetzt. Ein CTI von 0,9 (ein Durchgang von 90% der Zelltrümmer) wurde als minimale Voraussetzung für ein stabiles Bett beschrieben. Brixius gelang es ebenfalls, eine Veränderung des Zeta-Potentials mit der Zelltrümmergröße und somit mit der Aufschlussmethode zu korrelieren. Bei einer Leitfähigkeit von 10 mS/cm lagen die Zeta-Potential Messwerte für die verschiedenen Aufschlussmethoden zwischen -16 und -20 mV.

Große Zellaggregate sind in der Expanded Bed Chromatographie ebenfalls problematisch, da sie Trenngitter und Strömungsverteiler verstopfen können, was zu Turbulenzen und damit zu einer verbreiterten Verweilzeit führt. Diesem Problem kann mit konstantem Rühren des Aufgabeguts entgegenwirkt werden [Anspach et al., 1999].

2.2.4 Adsorption

Die Adsorption basiert auf den intermolekularen Wechselwirkungen von Adsorber und Adsorbens. Die auftretenden Kräfte und ihre Reichweiten für Kugel/Kugel Symmetrie sind in Tab. 3 dargestellt.

Tab. 3: Elektrische Wechselwirkungen zwischen Molekülen [Daune, 1997]

Wechselwirkung	Stärke	Abstandsabhängigkeit (ohne / mit Brownscher Molekularbewegung)
Ion - Ion	Sehr stark	$1/r$ / $1/r$ relativ hohe Reichweite
Ion - Dipol	Stark	$1/r^2$ / $1/r^4$ kurze Reichweite
Dipol - Dipol	Mäßig stark	$1/r^3$ / $1/r^6$ kurze Reichweite
Ion - induzierter Dipol	Schwach	$1/r^4$ / $1/r^4$ sehr kurze Reichweite
Dipol - induzierter Dipol	Sehr schwach	$1/r^6$ / $1/r^6$ äußerst kurze Reichweite
induzierter Dipol - induzierter Dipol	Sehr schwach	$1/r^6$ / $1/r^6$ äußerst kurze Reichweite

Viele der Intermolekularen Kräfte werden in der Literatur nach ihren Entdeckern benannt:

- **Keesom-Kräfte:** Elektrostatische Wechselwirkungen
Sie treten zwischen permanenten elektrischen Momenten (z.B. Dipolmomenten) auf. Die Stärke dieser Kräfte ist von der Orientierung der Momente zueinander abhängig. Daher können sie sowohl anziehender als auch abstoßender Natur sein.
- **Debye-Kräfte:** Induktionswechselwirkung
Sie werden dadurch hervorgerufen, dass das permanente elektrische Moment eines Moleküls in einem anderen ein Dipolmoment induziert. Die Stärke der stets attraktiven Kräfte ist von der Polarisierbarkeit des beeinflussten Moleküls abhängig.
- **London-Kräfte:** Dispersionswechselwirkung
In jedem Atom verändert sich aufgrund der Elektronenbewegung ständig die Ladung. Die daraus resultierenden Dipole beeinflussen benachbarte Moleküle. London-Kräfte existieren zwischen allen Atomen und Molekülen und wirken

Theoretische Grundlagen

immer anziehend. Ein Sonderfall sind π - π -Wechselwirkungen, die zwischen Aromaten auftreten können. Sie sind stärker als die London-Kräfte, da die Ladungen in konjugierten π -Systemen viel beweglicher sind.

Die verschiedenen Wechselwirkungen von Proteinen an porösen Materialien lässt sich auf die Summe weniger Kräfte zurückführen [Anspach, 1998].

- Unpolare, Lifshitz-van-der-Waals-(LW) Wechselwirkungen (anziehend)
Unter dem Namen Lifshitz-van-der-Waals-Kräfte werden im allgemeinen die Interaktionen von Dipolen und induzierten Dipolen zusammengefasst. Dies umfasst also die Keesom-, Debye- und Londonkräfte. Aufgrund der gegenseitigen Wechselwirkungen untereinander nimmt die Kraft der Wechselwirkung insgesamt mit dem Quadrat des Abstands ab.
- Polare, Elektronenpaar-Donor-Akzeptor (AB) Wechselwirkungen
Die Wechselwirkungen zwischen Lewis-Säuren und Lewis-Basen sind attraktiver Natur. Liegt aber nur der Donor oder der Akzeptor vor, so können auch repulsive Kräfte auftreten. Die dabei auftretenden Abstoßungskräfte können zwei Größenordnungen über den unpolaren Wechselwirkungen liegen und so einer Agglomeration von Proteinen, die aufgrund der unpolaren Wechselwirkungen stattfinden müsste, entgegenwirken.
- Elektrostatische Wechselwirkungen (ladungsabhängig)
Diese Kräfte basieren auf Ion-Ion Wechselwirkungen.
- Brownsche Bewegung (abstoßend)
Die Brownsche Molekularbewegung ist nicht gerichtet und wirkt aus diesem Grund immer einer Adsorption entgegen. Da die Energie unabhängig von der Molekülgröße ist, ist ihr Einfluss nur bei kleinen Molekülen relevant.

Die Einbeziehung der polaren Wechselwirkungen stellt eine wesentliche Erweiterung der klassischen DLVO Theorie (benannt nach den Entwicklern Derjaguin, Landau, Verwey und Overbeek) dar, die nur für unpolare und geladene Oberflächen und Moleküle Gültigkeit hat. Für die polaren Oberflächen von Proteinen stellen die polaren Wechselwirkungen sogar die ausschlaggebenden Kräfte dar [Anspach, 1998].

Die Adsorption lyophiler (hydrophober) Moleküle an lyophilen Trägern ist auf den Entropiegewinn durch die Verringerung der Oberfläche bei der Adsorption zurückzuführen. Chaotrope Salze wie z.B. Natriumsulfat binden das Wasser, wodurch Substanzen mit geringerer Polarität leichter an wenig polaren Oberflächen adsorbieren. Dieser Effekt wird z.B. bei der hydrophoben Interaktionschromatographie ausgenutzt. Bei Ionenaustauschern dominieren die elektrostatischen Wechselwirkungen. Zusätzlich werden Wassermoleküle koordinativ gebunden, so dass zusätzlich polare Wechselwirkungen ausgebildet werden. Wichtig bei den Oberflächen der Ionenaustauscher ist die Möglichkeit, die Ladungen durch die Veränderung des pH-Wertes zu neutralisieren und so die Polarität stark zu verringern.

Hydrophile (aber nicht geladene) Materialien werden oft als neutrale Matrices von Ionenaustauschern eingesetzt. Sie haben nur wenige Wechselwirkungen mit Proteinen, da sie von einer ein bis zwei Molekül starken Wasserschicht umgeben sind, die für eine sterische Abstoßung sorgt. Als Maß für die Summe der verschiedenen Oberflächenkräfte sowie der Interaktion mit dem Lösungsmittel kann das Zeta-Potential herangezogen werden.

2.2.4.1 Das Zeta-Potential

Das Zeta-Potential wird insbesondere in der Dispersions- und Emulgiertechnik zur Beschreibung von geladenen Partikeloberflächen in wässrigen Lösungen herangezogen. Mit seiner Hilfe können Aussagen über die Stabilität bzw. die Neigung zur Koaleszenz oder Agglomeration eines dispersen Systems gemacht werden.

Wird ein Partikel mit negativem Oberflächenpotential in einer elektrolythaltigen Lösung suspendiert, so wird er in der Regel mit einer Monoschicht aus negativ geladenen, nicht hydratisierten Ionen bedeckt (Abb. 13). Dies ist zunächst überraschend, denn die negativen Ladungen sollten sich gegenseitig abstoßen. Bei kurzen Entfernungen des Ions zum Partikel überwiegen jedoch die attraktiven van-der-Waals Kräfte. Da die Hydrathüllen um negative Ionen (Anionen) wesentlich schwächer als um positive Ionen (Kationen) herum ausgebildet sind, sind es in der Regel Anionen, die ihre Hydrathülle abstreifen und die durch van-der-Waals Kräfte fest adsorbierte innere Helmholtzschicht bilden [Müller, 1996b].

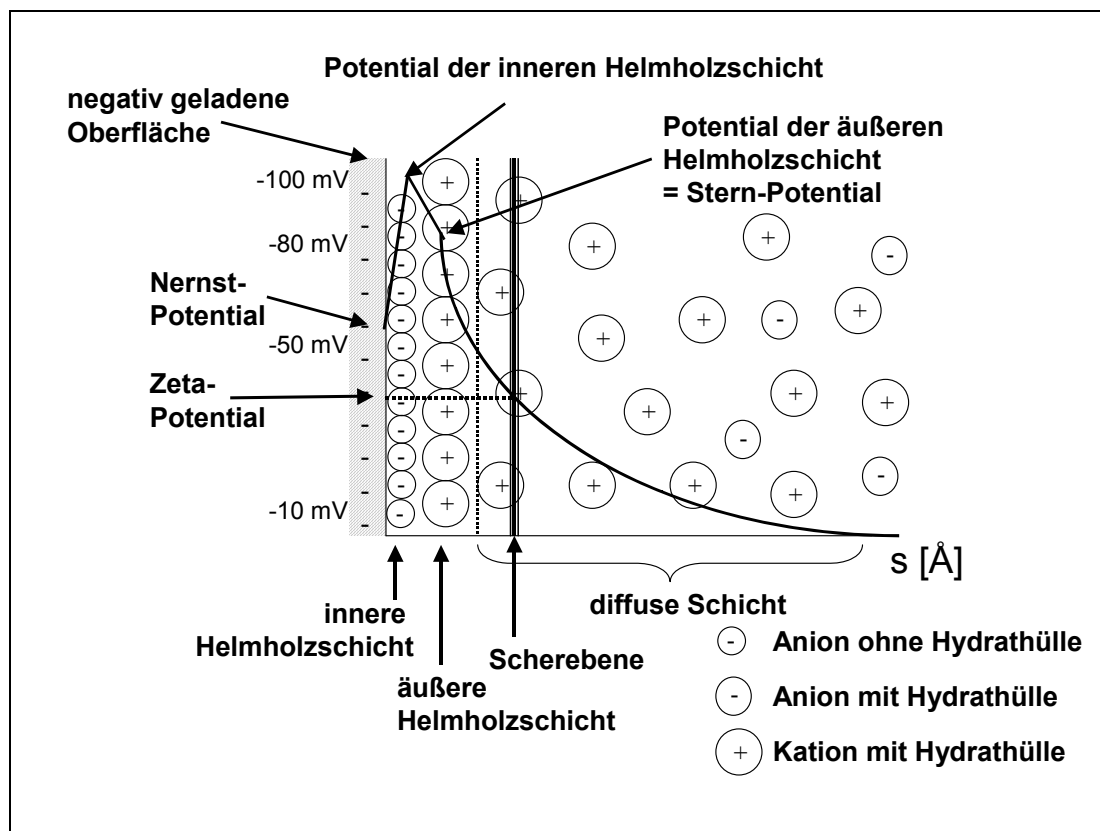


Abb. 13: Schema zur Erklärung des Zeta-Potentials an einem negativ geladenem Partikel (nach [Müller, 1996b])

Theoretische Grundlagen

Der Betrag des Potentials an der Oberfläche des Partikels (Nernst-Potential) steigt durch diese Schicht scheinbar und sorgt nun für eine stärkere Abstoßung negativer Ionen. Daher besteht die nächste Schicht aus hydratisierten, ebenfalls fest adsorbierten Kationen. Sie bilden die äußere Helmholtzschicht, die durch ihre positive Ladung den Betrag des Potentials verringert. Die innere und äußere Helmholtzschicht bilden zusammen die Sternschicht (Ionendoppelschicht).

An die Sternschicht grenzt die diffuse Schicht. Sie besteht aus locker gebundenen Kationen, deren Anzahl abhängig vom Abstand zum Partikel abnimmt bzw. in der die Anzahl der Anionen mit dem Abstand zunimmt. Theoretisch erreicht das Potential erst im unendlichen den Wert Null, für Berechnungen wird jedoch angenommen, dass die diffuse Schicht bei einem Potential von $1/e$ endet. Bei der Betrachtung von Potentialen ist aus praktischen Gründen zumeist der Betrag des Potentials gemeint.

Bei der Bewegung des Partikels (z.B. durch Diffusion) wird je nach Bewegungsgeschwindigkeit ein Teil der diffusen Schicht abgestreift. Das Partikel ist nun nach außen hin nicht mehr neutral, und bewegt sich im elektrischen Feld in Richtung Anode. Oberhalb einer kritischen Feldstärke ist die diffuse Schicht nahezu vollständig abgestreift und das Zeta-Potential (gemessen über die Bewegungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld) nähert sich dem Stern-Potential an. Bei Lösungen mit geringen Elektrolytkonzentrationen (z.B. $50 \mu\text{S/cm}$) ist der Potentialabfall in der diffusen Schicht sehr langsam. Das in dieser Lösung gemessene Zeta-Potential entspricht praktisch dem Stern-Potential. Bei hohen Salzgehalten wird aufgrund des sehr schnellen Abfalls des Potentials ein deutlich niedrigerer Wert (Betrag) für das Zeta-Potential gemessen (Abb. 14, links). Zum Vergleich von Zeta-Potential Messwerten sollte also stets darauf geachtet werden, dass die Salzkonzentration (gemessen über die Leitfähigkeit) identisch ist.

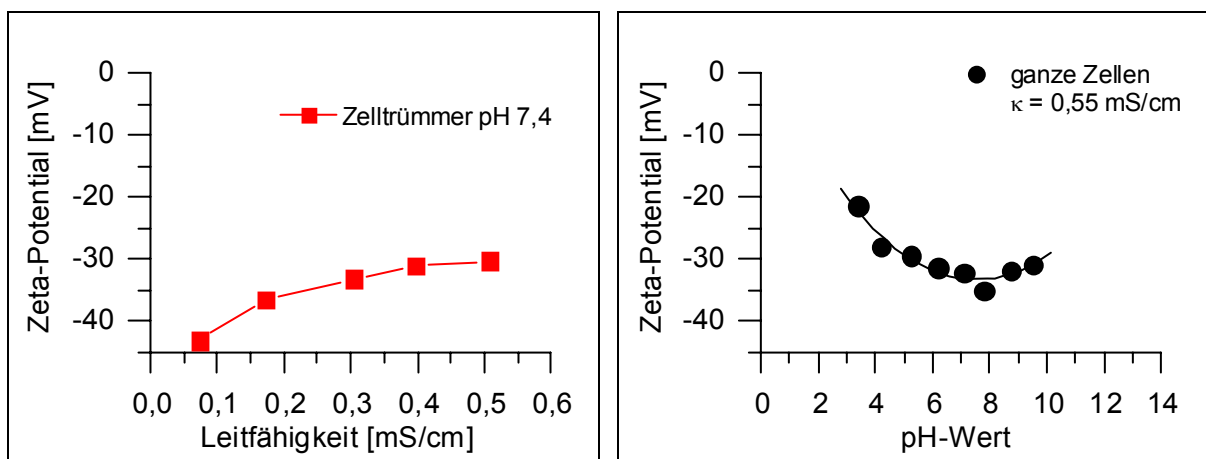


Abb. 14: links: Abhängigkeit des Zeta-Potentials von der Leitfähigkeit bei Verdünnungen (1:100) von *B. megaterium* - Zelltrümmern mit Tris-Puffer verschiedener Konzentrationen (0 bis 50 mM)
rechts: Abhängigkeit des Zeta-Potentials ganzer Zellen vom pH-Wert bei konstanter Leitfähigkeit (κ)

Biologische Moleküle können abhängig vom pH-Wert positiv oder negativ geladen sein. Am isoelektrischen Punkt beträgt ihre Gesamtladung Null. Dies hat natürlich auch Auswirkungen auf das Zeta-Potential, so dass bei der Messung des Zeta-Potentials auch auf einen konstanten pH-Wert geachtet werden sollte. Die Zellwände ganzer Zellen sind in der Regel negativ geladen. Daher liegt der isoelektrische Punkt der ganzen Zellen bei sehr sauren pH-Werten. Wie in Abb. 14 rechts zu sehen ist, wurde er bei den Untersuchungen, die den üblichen Arbeitsbereich in der Biotechnologie abdecken, nicht erreicht.

2.2.4.2 Modelle zur Beschreibung der Proteinadsorption

Das bekannteste und meistgenutzte Modell zur Beschreibung der Adsorption einer Komponente ist die Modellvorstellung nach **Langmuir**. Das Modell der Langmuir Adsorptionsisotherme basiert auf einer festen Anzahl von äquivalenten Adsorberplätzen, die alle unabhängig voneinander mit einer Monoschicht belegt werden können. Damit ergibt sich für den Gleichgewichtszustand folgende Gleichung:

$$q^* = \frac{c^* q_m}{c^* + K_d} \quad \text{Gleichung 33}$$

Die Beladung (q^*) ist von der Gleichgewichtskonzentration (c^*), der maximalen Beladung q_m und der Konstante K_d abhängig. Mit dem Langmuir Modell können viele chromatographische Phänomene beschrieben werden, jedoch meist nur qualitativ. Häufig ist es sinnvoll, die Gleichung 33 um den Term $+\lambda \cdot c^*$ zu erweitern [Nicoud und Seidel-Morgenstern, 1996]. Darin stellt λ eine zweite Konstante dar.

Eine weiteres Modell zur Beschreibung von Adsorptionsvorgängen wurde von **Freundlich** entwickelt. Mit der Annahme, dass die Adsorptionseenthalpie exponentiell mit der Beladung abnimmt, lässt sich die Freundlich Isotherme ableiten:

$$q^* = \kappa (c^*)^\eta \quad \text{Gleichung 34}$$

Die rein empirischen Koeffizienten κ und η (in der Regel ist $\eta < 1$) ermöglichen die Berücksichtigung von Protein–Protein–Interaktionen. Die Beziehung kann entweder selbst oder als Erweiterung des Langmuir–Modells (Gleichung 35) zur Beschreibung der Proteinadsorption herangezogen werden.

$$q^* = \frac{q_m (c^*)^\eta}{K_d + (c^*)^\eta} \quad \text{Gleichung 35}$$

Eine weitere Kombination der Langmuir und Freundlich Isothermen wurde 1959 von **Redlich und Peterson** [Peterson und Redlich, 1962] vorgeschlagen:

$$q^* = \frac{a_{RP} \cdot c^*}{1 + b_{RP} (c^*)^{\eta_{RP}}} \quad \text{Gleichung 36}$$

Theoretische Grundlagen

Die 1938 von **Brunauer, Emmet und Teller** formulierte BET-Isotherme berücksichtigt die Ausbildung mehrerer Schichten in der adsorbierten Phase:

$$q^* = q_s \frac{C_{\text{BET}} \cdot \frac{c^*}{C_0}}{\left(1 - \frac{c^*}{C_0}\right) \cdot \left(1 + (C_{\text{BET}} - 1) \frac{c^*}{C_0}\right)} \quad \text{Gleichung 37}$$

Die BET-Isotherme hat die drei freien Parameter q_s , C_{BET} und C_0 .

Auf der Grundlage der statistischen Thermodynamik hat **Hill** 1960 folgendes Modell abgeleitet:

$$q^* = q_s \frac{c^* \cdot (b_1 + 2b_2 c^* + 3b_3 (c^*)^2 + \dots + nb_n (c^*)^{n-1})}{1 + b_1 c^* + b_2 (c^*)^2 + b_3 (c^*)^3 + \dots + b_n (c^*)^n} \quad \text{Gleichung 38}$$

Diese Gleichung beschreibt die Sättigungskapazität des Adsorbens als $n \cdot q_s$. Der Parameter b ist temperaturabhängig. Die sich aus dieser Gleichung ableitende Approximation erster Ordnung entspricht der Langmuir Isothermen, Approximationen zweiter und dritter Ordnung können bereits Isothermen mit Wendepunkt beschreiben [Seidel-Morgenstern, 1995].

Zhu und Gu [Zhu und Gu, 1989] [Seidel-Morgenstern, 1995]. veröffentlichten 1989 ebenfalls ein Modell, das mit seinen drei freien Parametern k_1 , k_2 und n Isothermenverläufe mit Wendepunkt wiedergeben kann.

$$q^* = q_s \frac{k_1 c^* \left(\frac{1}{n} + k_2 (c^*)^{n-1} \right)}{1 + k_1 c^* \cdot (1 + k_2 (c^*)^{n-1})} \quad \text{Gleichung 39}$$

Auch für Mehrkomponentenmodelle liegen verschiedene Ansätze vor. Als Beispiele seien hier das nicht-kompetitive und das kompetitive Adsorptionsmodell erwähnt.

Im nicht-kompetitiven Modell (Bilangmuirmodell) wird davon ausgegangen, dass die Adsorberplätze unterschiedlich sind, so dass jedes Protein unabhängig von seinem Konkurrenten adsorbiert wird. Die Gleichgewichtskonzentration wird für beide Proteine mit dem Langmuir-Modell beschrieben.

Im kompetitiven Adsorptionsmodell sind die Adsorberplätze gleich und daher für beide Komponenten gleichermaßen zugänglich.

$$q_i^* = \frac{q_m K_a c_i^*}{1 + \sum_j K_{aj} c_j^*} \quad \text{Gleichung 40}$$

Voraussetzung für dieses aus der Gasadsorption entwickelte Modell ist die gleiche Kapazität für verschiedene Komponenten. Aufgrund der verschiedenen Größen und Oberflächeneigenschaften von Proteinen ist diese Voraussetzung jedoch nicht erfüllt.

Eine Erweiterung von Skidmore berücksichtigt diese durch die Einführung dimensionsloser Beladungskoeffizienten. Sie geben das Verhältnis der Gleichgewichtsbeladung zur maximalen Beladung für diese Komponente an.

Fritz und Schlünder [Fritz und Schlünder, 1974] schlugen 1974 eine weitere Gleichung zur Beschreibung von Gemischisothermen vor:

$$q_i^* = \frac{a_{i0} (c_i^*)^{b_{i0}}}{d_i + \sum_{j=1}^k a_{ij} (c_j^*)^{b_{i0}}} \quad \text{Gleichung 41}$$

Für $b_{i0} = b_{ij} = d_i = 1$ ergibt sich die Multi-Langmuir Gleichung. Durch die zusätzlich eingeführten, empirischen Parameter ist Gleichung 41 sehr flexibel, aber auch thermodynamisch inkonsistent [Seidel-Morgenstern, 1995].

Eine weitere Theorie zur Mehrkomponentenadsorption aus der Gasphase wurde von Myers und Prausnitz [Myers und Prausnitz, 1965] entwickelt und später für den Fall verdünnter Lösungen erweitert [Radke und Prausnitz, 1972]. Die IAS-Theorie (ideal adsorbed solution, IAS) gestattet die Abschätzung von Gemischisothermen auf der Grundlage von Einzelisothermen ohne zusätzliche Parameter. Um auch höher konzentrierte Lösungen zu beschreiben, wurde die Einführung von Aktivitätskoeffizienten (RAS, real adsorbed solution) vorgeschlagen [Myers, 1983]. Auch eine Erweiterung des Modells zur Berücksichtigung der energetischen Heterogenität der Adsorbentoberfläche (HIAS) konnte entwickelt werden [Valenzuela et al., 1988].

Zur Betrachtung von Elutionsvorgängen durch Salzgradienten entwickelten **Brooks und Cramer** [Brooks und Cramer, 1992] das SMA-Modell (steric mass action).

$$c_2^* = \left(\frac{c_1^*}{\Lambda - (z_2 + \sigma_2) q_2^*} \right)^{z_2} \cdot \frac{q_2^*}{K_2} \quad \text{Gleichung 42}$$

In diesem impliziten Modell wird das Protein ($i=2$) mit z_2 Ladungen an die stationäre Phase gebunden. Dabei schirmt es σ_2 Bindungsstellen an der Sorbensoberfläche ab. Die Gleichgewichtslage wird mit der Gleichgewichtskonstanten K_2 beschrieben. Λ bezeichnet die Gesamtkapazität für ein monovalentes Gegenion. Mit diesen experimentell ermittelten Parametern ist anschließend iterativ die Proteinkonzentration c_2 in Abhängigkeit der Salzkonzentration c_1 zu ermitteln. Dieser iterative Prozess erfordert bei der Modellierung einen höheren Rechenaufwand als bei anderen Modellen [Garke, 2000].

2.2.4.3 Einflussfaktoren auf die Adsorption

Im Folgenden werden einige Einflussgrößen auf die Adsorption diskutiert. Die Diskussion umfasst verschiedene Stofftransportwiderstände, den pH-Wert, die Ionenstärke und die Temperatur.

Stofftransportwiderstände

Auf dem Weg zur Adsorption sind die Moleküle einigen Widerständen ausgesetzt, die die Adsorption verlangsamen können: der Filmdiffusion, der Porendiffusion und der

Theoretische Grundlagen

Oberflächendiffusion. Für die Berechnung der Adsorptionskinetik ist aber nur der langsamste, also geschwindigkeitsbestimmende Schritt entscheidend. Ist die Adsorption selbst der geschwindigkeitsbestimmende Schritt, so spielen die Transportwiderstände keine Rolle.

- **Filmdiffusion**

Bevor ein Molekül an einer Oberfläche adsorbieren kann, muss es zunächst durch einen Flüssigkeitsfilm diffundieren, der fest an der Oberfläche angelagert ist. Innerhalb dieses Films findet der Transport nicht durch Konvektion, sondern durch Diffusion statt. Der Stoffstrom J durch eine Schicht der Dicke δ wird in der Regel durch das erste Fick'sche Gesetz beschrieben:

$$J = -D_b \frac{\partial c}{\partial \delta} \quad \text{Gleichung 43}$$

Eine Erhöhung der Strömungsgeschwindigkeit führt zu einer Verringerung der Filmdicke und somit zu einer Vergrößerung des Stoffstroms.

- **Porendiffusion**

Die Porendiffusion in den mit Flüssigkeit gefüllten Poren läuft nach dem gleichen Mechanismus ab wie die Diffusion in freier Lösung. Durch die Porenverzweigungen und -verengungen ist der Porendiffusionskoeffizient D_p jedoch stets kleiner als der Diffusionskoeffizient D_b in freien Lösung. Dies kann durch die Einführung des Labyrinthfaktors τ_p berücksichtigt werden. Die Wechselwirkungen zwischen den Porenwänden und dem Molekül können durch den Hinderungsfaktor λ berücksichtigt werden. Er ist vom Verhältnis des Porendurchmessers zum Moleküldurchmesser abhängig.

$$D_p = \frac{D_b \cdot \varepsilon_p \cdot \lambda}{\tau_p} \quad \text{Gleichung 44}$$

- **Oberflächendiffusion**

Bei der Proteinadsorption konnte mittels konvokaler Lasermikroskopie nachgewiesen werden, dass Proteine ihre Position innerhalb eines Adsorberpartikels ändern können. Dabei gleiten die Moleküle auf der Porenoberfläche nach Überwindung einer Aktivierungsenergie ohne Desorption ins Innere.

Einfluss des pH-Werts auf die Adsorption

Der pH-Wert hat einen entscheidenden Einfluss auf die Adsorption von Proteinen, da er die Ladung der einzelnen Aminosäuren, den Grundbausteinen der Proteine, verändern kann. Durch die Änderung des pH-Wertes kann also die Oberflächenladung sowie die Nettoladung eines Proteins eingestellt werden. Am isoelektrischen Punkt ist die Nettoladung eines Proteins gleich Null. Aufgrund ihrer heterogenen Ladungsverteilung enthält die Oberfläche allerdings immer noch Bereiche positiver und negativer Ladung (Abb. 15).

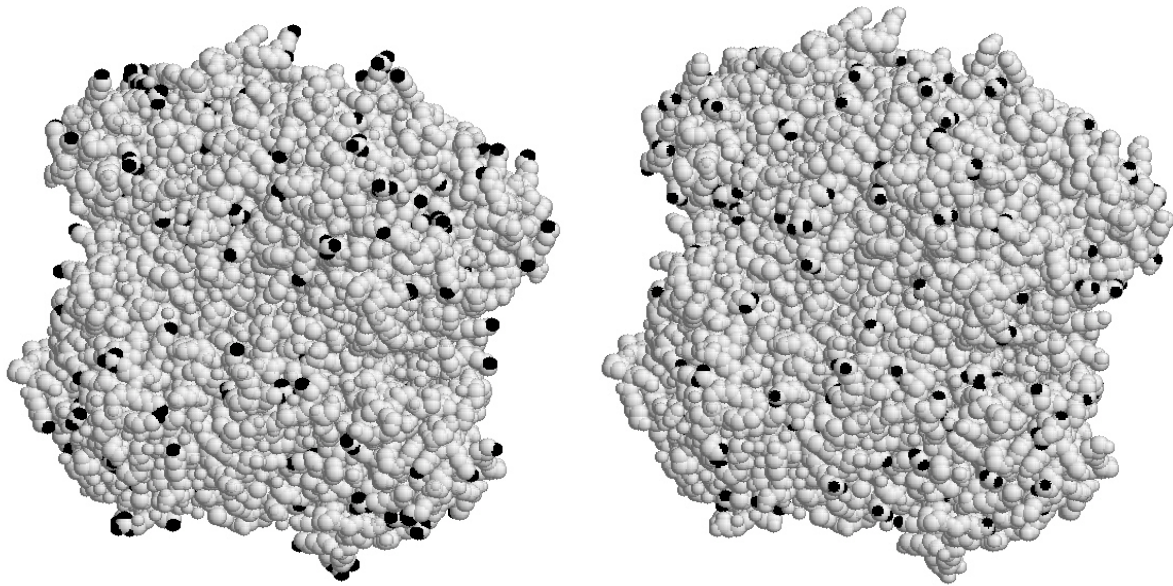


Abb. 15: Beispiel für die Verteilung geladener Gruppen an einem Protein. Catalase aus *S. cerevisiae*; links: Basische Stickstoffatome schwarz; rechts: Saure Sauerstoffatome schwarz

Ist ein Protein überwiegend positiv geladen, so kann es mit einem negativ geladenen Kationenaustauscher aufgereinigt werden. Sollte jedoch der pH-Wert zu diesem Zweck zu sauer gewählt werden, so werden auch die negativen Gruppen des Kationenaustauschers durch die H_3O^+ -Ionen neutralisiert und stehen für die Aufreinigung nicht mehr zur Verfügung. Die Kapazität des Ionenaustauschers nimmt also ab. Gleiches gilt auch im Fall von Anionenaustauschern und hohen pH-Werten. Im Allgemeinen werden Proteine aber nicht bei extremen pH-Werten aufgereinigt, da diese zur Veränderung der Struktur und damit zur Inaktivierung der Enzymfunktion führen.

Im Fall der Expanded Bed Anwendung muss auch der Einfluss des pH-Wertes auf die Oberflächenladung (und damit das Zeta-Potential) der Zelltrümmer berücksichtigt werden. Abhängig von der Oberflächenladung haben auch die Zelltrümmer die Möglichkeit, mit den Adsorberpartikeln zu interagieren und so die Verweilzeitverteilung zu verschlechtern [Brixius, 2003]. Auf diesen Punkt wird jedoch noch näher im Kapitel 4.4, S. 89, eingegangen.

Einfluss der Ionenstärke auf die Adsorption

Die Ionenstärke ist neben dem pH-Wert der wichtigste Parameter bei der Ionenaustauschchromatographie. Die Ionen der Salze konkurrieren mit den Proteinen um die Bindungsplätze auf dem Adsorber. Aus diesem Grund sollte während der Adsorption des Proteins an einen Ionenaustauscher mit einer niedrigen Ionenstärke gearbeitet werden, während die Elution durch hohe Ionenstärke hervorgerufen werden kann.

Einfluss der Temperatur auf die Adsorption

Allgemein gilt, dass bei niedrigeren Temperaturen die Adsorption auf einer Oberfläche zunimmt [Zhou und Zhang, 2001].

Theoretische Grundlagen

Da der Arbeitsbereich bei der Proteinreinigung aber nach oben hin durch die Protein-stabilität und nach unten hin durch den Gefrierpunkt der Lösung determiniert ist, hat die Temperatur auf die Adsorption nur einen geringen Einfluss. Trotzdem sollte eine Proteinreinigung stets bei niedrigen Temperaturen stattfinden, da so die Aktivität von proteinabbauenden Enzymen (Proteasen) verringert werden kann.

2.2.5 Strömungsverteiler

Um eine möglichst schmale Verweilzeitverteilung zu erhalten, muss das Expanded Bed absolut vertikal stehen und gleichmäßig von unten angeströmt werden. Bei Säulen mit geringem Durchmesser geschieht die Anströmung über eine Lochplatte oder eine Kugelschüttung. Hubbuch et al. [Hubbuch et al., 2002] stellten einen Strömungsverteiler für eine Säule von 150 cm Durchmesser vor. Ausgehend von einer zentralen Verteilungskammer wird die Suspension durch 12 sternförmig angebrachte Rohre in die Säule geleitet. Jedes Rohr hat vier Öffnungen, durch die die Suspension in Richtung Säulenboden gepumpt wird. Die Strömungseigenschaften im Expanded Bed konnten durch langsame Drehung des Strömungsverteilers inklusive der daran angebrachten Rohre deutlich verbessert werden. Seit 2004 ist ein sehr ähnliches System mit vier in der Drehbewegung oszillierenden Armen unter dem Namen STREAMLINE Direct auf dem Markt erhältlich [GE Healthcare, 2004].

2.2.6 Modellierung der Expanded Bed Chromatographie

Eine Modellierung der Expanded Bed Chromatographie hat zum Ziel, die örtlichen und zeitlichen Konzentrationsverläufe einer oder mehrerer Komponenten zu bestimmen. Die dabei verwendeten mathematischen Modelle finden sich auch in der Modellierung von Festbetten (wie z.B. HPLC) wieder und lassen sich in drei Kategorien einteilen [Seidel-Morgenstern, 1995; Garke, 2000]:

- Gleichgewichtsmodelle
- Zellenmodelle (Rührkesselkaskade und Craig-Modell)
- Kinetische Modelle

Das **Gleichgewichtsmodell** setzt zu jeder Zeit an jedem Ort der Säule das Vorliegen eines Gleichgewichts zwischen mobiler und stationärer Phase voraus. Stofftransportwiderstände und Rückvermischungseffekte werden dabei vernachlässigt. Aus diesem Grund finden sie bei der Expanded Bed Chromatographie keinen Einsatz.

Bei den **Zellenmodellen** wird die Trennsäule in eine Anzahl von gleichartigen Zellen unterteilt, in denen jeweils ein Gleichgewicht zwischen stationärer und mobiler Phase besteht [Palsson et al., 2001]. Zur Beschreibung werden in der Regel zwei Modellvorstellungen genutzt: Das eine basiert auf den Modellgleichungen zur Beschreibung einer kontinuierlich durchströmten Rührkesselkaskade, das andere auf einer diskre-

ten Aufenthaltszeit eines Teils der mobilen Phase in einer Zelle, verbunden mit einer Gleichgewichtseinstellung (Craig-Modell).

Kinetische Modelle basieren auf differentiellen Massenbilanzen und berücksichtigen die Kinetik des Stoffaustausches sowie Rückvermischungseffekte. In ihnen lassen sich auch Effekte wie Gradienten in der mobilen Phase oder eine irreversible Adsorption berücksichtigen. Aufgrund dieser Flexibilität findet das kinetische Modell in der Modellierung der Expanded Bed Adsorption bevorzugten Einsatz.

Bei der Modellierung des Gesamtprozesses können folgende Einzelschritte unterschieden werden:

- **Bettexpansion**
Dieser Faktor ist für die Feststoffkonzentration entscheidend. Die dabei eingesetzten Gleichungen wurden bereits in Abschnitt 2.2.2 auf S. 30 dargestellt. Kaczmariski und Bellot [Kaczmariski und Bellot, 2004] bezogen auch die ungleichmäßige Partikelgröße und Feststoffverteilung über der Höhe der expandierten Schicht in ein Modell mit ein.
- **Konvektion**
Die Konvektion wird in der Regel mit dem axialen Dispersionsmodell beschrieben (siehe Abschnitt 2.2.3 auf S. 31). Fenneteau et al. [Fenneteau et al., 2003] berücksichtigten neben der axialen Dispersion, die sie aus der Peclet Zahl der Partikel ableiteten, noch ein radiales Strömungsprofil.
- **Filmdiffusion**
Die Filmtheorie geht von einem stationären Film der mobilen Phase an Oberflächen aus. Der Stofftransport durch diesen Film wird in der Regel mit dem ersten Fick'schen Gesetz beschrieben.
- **Interpartikulärer Stofftransport**
Der Stofftransport innerhalb eines Partikels wird durch die Porenverzweigungen sowie Wechselwirkungen mit den Porenwänden deutlich gehemmt (siehe auch S. 41). Große Adsorberpartikel sowie kleine Poren führen zu einem langsameren Transport. Auch der Stofftransport durch Oberflächendiffusion kann berücksichtigt werden [Garke, 2000]. Da die Größe der Adsorberpartikel nicht über der Höhe gleich ist, wurde dies in einigen Modellen berücksichtigt [Tong et al., 2003; Kaczmariski und Bellot, 2004].
- **Adsorption/Desorption**
Der Adsorptions- /Desorptionsprozess innerhalb einer Expanded Bed Anlage wird häufig mit dem Langmuir-Modell (Gleichung 33) beschrieben [Garke, 2000; Chen et al., 2003; Tong et al., 2003]. Zur Beschreibung der Elution mittels eines Salzgradienten wird das SMA-Modell (Gleichung 42, S. 41) eingesetzt [Chen et al., 2003].

Theoretische Grundlagen

2.3 Dextransucrase

Das Enzym Dextransucrase (EC 2.4.1.5) spaltet die energiereiche glycosidische Bindung der Saccharose, so dass die beiden Monosaccharide Glucose und Fruktose entstehen. Während die Fruktose ein Endprodukt darstellt, wird mit Hilfe der gespeicherten Bindungsenergie die Glucose auf einen Akzeptor übertragen. Abhängig von dem Akzeptor und von der Bindungsstelle entstehen verschiedene Produkte.

Tab. 4: Beispiele für die Produkte des Enzyms Dextransucrase

Akzeptor	glycosidische Bindung	Produkt
Dextran mit n Glucoseeinheiten	überwiegend α -1,6 seltener α -1,2; α -1,3; α -1,4	Dextran mit n+1 Glucoseeinheiten
Glucose	α -1,6	Isomaltose
Isomaltose	α -1,6	Isomaltotriose
Fruktose	α -1,5	Leucrose

Die in Tab. 4 gezeigten Beispiele geben nur einen kleinen Teil möglicher Reaktionen wieder. In Abwesenheit von Akzeptoren werden Glucoseeinheiten zu einer Dextrankette verknüpft. Abhängig von der Akzeptorkonzentration kann diese Polymerisierung mehr oder weniger früh abgebrochen werden. Ist der Akzeptor Glucose, so kann bei hohen Glucosekonzentrationen der Kettenabbruch bereits bei einem Disaccharid (z. B. Isomaltose) erfolgen. Bei geringeren Glucosekonzentrationen entstehen Oligosaccharide (z.B. Isomaltotriose).

Dextransucrasen werden von verschiedenen Bakterien hergestellt und können sich in ihren katalytischen Eigenschaften deutlich unterscheiden. Dies betrifft nicht nur die maximale Reaktionsgeschwindigkeit, sondern auch das Akzeptorspektrum und die Endprodukte. Ferner können auch Eigenschaften wie Stabilität, Aktivatoren und Inhibitoren verschieden sein. Als Beispiel sei hier angegeben, dass bei der Dextransucrase aus *Leuconostoc mesenteroides* B-512F die Reaktionsgeschwindigkeit durch Zugabe von Ca^{2+} -Ionen deutlich gesteigert werden kann, dies aber bei der Dextransucrase aus *Streptococcus oralis* nur geringfügig möglich ist [Berensmeier, 2004]. Wie groß die Unterschiede bereits bei verschiedenen Isolaten des gleichen Bakterienstammes sind, zeigt Tab. 5. Es ist zu erkennen, dass der Anteil von Verzweigungen im Dextran unterschiedlich ist, obwohl alle Bakterien dem gleichen Stamm angehören.

Tab. 5: Dextranzusammensetzung in Abhängigkeit von der Enzymherkunft

Enzym	α -1,6	α -1,3	α -1,2	α -1,4
<i>L. mesenteroides</i> NRRL B-512F	95%	5%	0%	0%
<i>L. mesenteroides</i> NRRL B-1299	66%	7%	27%	0%
<i>L. mesenteroides</i> NRRL B-742	87%	0%	0%	13%

Theoretische Grundlagen

Industriell wird die Dextransucrase zur Zeit nur zur Produktion von Dextran eingesetzt. Eine Anlage zur Produktion von Leucrose bei der Firma Pfeifer & Langen (Köln, 1986) erwies sich nicht als rentabel [Buchholz et al., 1998]. Auch die Produktion von unverdaulichen Oligosacchariden mit Hilfe der Dextransucrase konnte sich bislang nicht gegen die Gewinnung aus Pflanzen (Sojabohnen, Chicory) durchsetzen [Van Loo et al., 1999].

In dieser Arbeit wurde hauptsächlich die Dextransucrase aus *Streptococcus oralis* eingesetzt. Das pH-Optimum dieses Enzyms liegt bei 7,0 und die Reaktion hat ein Temperaturoptimum von 38°C. Der K_M Wert liegt bei 0,9 mmol/l. Verglichen mit der Dextransucrase aus *L. mesenteroides* bilden beide Enzyme die gleichen Akzeptorprodukte mit Fructose und Maltose. Beim Einsatz von Glucose wird jedoch als Nebenprodukt bei der Dextransucrase aus *S. oralis* ein bisher noch nicht identifizierter Zucker gebildet [Berensmeier, 2004].

Die Enzymaktivität wird in der Einheit Unit angegeben. Ein Unit entspricht dem Verbrauch von 1 μmol Substrat (Saccharose) pro Minute in 20 mM Natriumacetatpuffer (+ 50 mg/l CaCl_2) pH 5,2 bei 30°C.

3 Material und Methoden

3.1 Methoden der Kultivierung

Für die Zellaufschlussexperimente wurden die beiden Stämme *Escherichia coli* TG1 der Firma Stratagene und *Bacillus megaterium* MS941 fermentiert. Der Stamm *B. megaterium* MS941 wurde von den molekularbiologischen Gruppen des Sonderforschungsbereichs 578, innerhalb dessen diese Arbeiten angesiedelt waren, zur Verfügung gestellt.

Escherichia coli (*E. coli*) ist ein Gram negatives, stäbchenförmiges Bakterium, das vor allem im Darm höherer Lebewesen vorkommt und daher zur Gruppe der Enterobacteriaceae gezählt wird. Bestimmte Arten sind Krankheitserreger für Diarrhöen und Harnwegsinfektionen, für eine physiologische Darmflora ist *E. coli* jedoch essentiell [Schlegel, 1985].

E. coli ist auch ein bedeutender Mikroorganismus für die Gentechnologie. Mit Hilfe von Bakteriophagen und Plasmiden lassen sich fremde Gene - auch menschliche - in dieses Bakterium einschleusen. *E. coli* lässt sich leicht gentechnisch verändern und erlaubt so die kostengünstige Massenproduktion von Proteinen. Biotechnologisch wird *E. coli* vor allem als Wirtsorganismus für die Expression nicht-glykosylierter Proteine verwendet, z.B. von Insulin, Wachstumshormonen und Antikörperfragmenten. Da *E. coli* Wildstämme in die Sicherheitsgruppe S2 fallen (weil sie den menschlichen Darm besiedeln und z. T. Krankheiten hervorrufen können), werden für Klonierungsexperimente attenuierte *E. coli*-Stämme (z.B. *E. coli* K12) benutzt, bei denen alle Risikofaktoren eliminiert wurden. Sie fallen daher in die Sicherheitsgruppe S1 und sind unter normalen mikrobiologischen Sicherheitsvorkehrungen kultivierbar.

Die Versuche zum Zellaufschluss wurden mit dem apathogenen *Escherichia coli* K12 Stamm TG1 durchgeführt. Dieser Stamm kann gut auf synthetischen Medien wachsen, weist allerdings eine Thiaminauxotrophie auf, die das Zufüttern dieses Vitamins notwendig macht. Zusätzlich wurde in den Bakterienstamm ein Plasmid (pTH275) eingebracht, durch das *E. coli* in die Lage versetzt wurde, das Enzym Dextranucrase (Donorstamm: *Streptococcus oralis*) zu produzieren und in bzw. auf Ampicillin haltigen Medien zu wachsen [Götze, 2003].

Bacillus megaterium gehört zu den Gram positiven Bakterien und ist ebenfalls stäbchenförmig. Es ist ein aerobes, heterotrophes Bodenbakterium und hat im Wildtyp die Fähigkeit, thermoresistente Endosporen als Dauerform zu bilden. Mit Zellabmessungen von zwei mal fünf Mikrometern ist *Bacillus megaterium* ein Riese unter den Eubakterien. Ferner hat es die Fähigkeit, Filamente sowie Zellketten auszubilden [Schlegel, 1985]. In dieser Arbeit wurden die Spezies DSM509 und MS941 verwandt. Beide können keine Endosporen bilden. Der Stamm *B. megaterium* hat den GRAS Status (generally regarded as safe) und wird aufgrund seiner ausgeprägten Fähigkeit zur Sekretion vielfach in der Industrie zur Gewinnung von Enzymen eingesetzt [Malten, 2002].

3.1.1 Kultivierung von *Escherichia coli*

Die Anzucht des Organismus geschah in mehreren 50 Liter und einem 30 Liter Batch-Ansatz. Die Fermentationsdauer betrug sieben bis acht Stunden, bevor ein starker Anstieg der Sauerstoffkonzentration im Medium anzeigte, dass die Kohlenstoffquelle, in diesem Fall Glucose, aufgebraucht war. Die Glucosekonzentration im Medium wurde so bemessen, dass gegen Ende der Fermentation gerade noch ein genügend hoher Sauerstoffeintrag gewährleistet werden konnte. Die Biotrockenmasse erreichte Konzentrationen um die 7 g/l (Abb. 16).

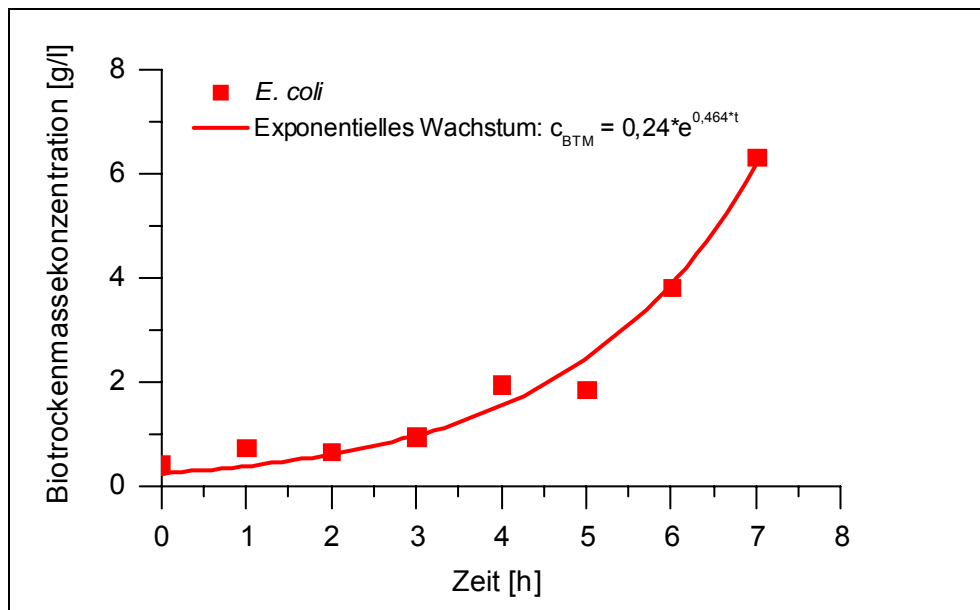


Abb. 16: Beispiel eines Fermentationsverlaufs von *E. coli*; V = 30 l; T = 37°C;

Die Biomasse wurde in der Röhrenzentrifuge CP41 der Firma Padberg vom Medium abgetrennt und anschließend in Puffer resuspendiert. Um eine gleichmäßige Verteilung der Biomasse zu erreichen, wurde die Suspension durch ein Sieb mit 200 µm Maschenweite gegeben. Nach Bestimmung der genauen Biotrockenmassekonzentration (siehe Kapitel 3.1.3, S. 53) wurde die Suspension fraktioniert und bis zu ihrem Einsatz eingefroren. Die Biotrockenmassekonzentration der eingefrorenen Stammlösung lag zwischen 150 g/l und 205 g/l. Für den Zellaufschluss wurden die Biotrockenmassekonzentrationen auf einen bestimmten Wert (meist 10 g/l) eingestellt. Somit konnten die Ergebnisse der freigesetzten Proteinmengen miteinander verglichen werden. Ein direkter Vergleich der erhaltenen Ergebnisse in Bezug auf die Enzymaktivität war jedoch nicht möglich, da die einzelnen Fermentationen zum Teil sehr unterschiedliche Ausgangsaktivitäten aufwiesen.

Medienzusammensetzung zur Anzucht von *E. coli*

Lösung 1 bis 5 werden steril vereinigt (Angaben für 1 Liter Medium). Die Volumina des Wassers wurden bei besonders großen oder kleinen Ansätzen zur besseren Handhabung verändert.

Material und Methoden

Lösung 1

Glucose · 1 H ₂ O	27,5	g
deion. Wasser	100	ml

anschließend autoklavieren

Lösung 2

KH ₂ PO ₄	13,3	g
(NH ₄) ₂ HPO ₄	4,0	g
Citrat	1,7	g
Fe(III)citrat	0,1	g
Spurensalzstocklösung	2,5	ml
deion. Wasser	888	ml

anschließend mit festem Natriumhydroxid auf pH 7 einstellen und autoklavieren

Lösung 3

MgSO ₄ · 7 H ₂ O	1,2	g
deion. Wasser	10	ml

anschließend autoklavieren

Lösung 4

Thiamin	4,5	mg
dest. Wasser	1	ml

anschließend sterilfiltrieren

Lösung 5

Ampicillin	0,1	g
dest. Wasser	1	ml

anschließend sterilfiltrieren

Zusammensetzung der Spurensalzlösung

	Konz. im Medium		Stocklösung	
CoCl ₂ · 6 H ₂ O	2,5	mg/l	1000	mg/l
MnCl ₂ · 4 H ₂ O	15,0	mg/l	6000	mg/l
CuCl ₂ · 2 H ₂ O	1,5	mg/l	600	mg/l
H ₃ BO ₃	3,0	mg/l	1200	mg/l
NaMoO ₄ · 2 H ₂ O	2,5	mg/l	1000	mg/l
Zn(CH ₃ COO) ₂ · 2 H ₂ O	13,0	mg/l	5200	mg/l
EDTA	8,4	mg/l	3360	mg/l

3.1.2 Kultivierung von *Bacillus megaterium*

Die Kultivierung des Stammes *B. megaterium* DSM509 wurde zunächst in 50 Liter Batch-Fermentationen in LB-Medium durchgeführt. Die erhaltenen Werte der Bio-trockenmassekonzentration nach 8 Stunden Fermentationszeit waren jedoch gering ($c_{\text{BTM}} = 2,66 \text{ g/l}$ bis $3,16 \text{ g/l}$). Hollmann und Deckwer entwickelten für den Stamm *Bacillus megaterium* WH320 ein Protokoll für eine Hochzelldichtefermentation [Hollmann und Deckwer, 2004]. Dieses ließ sich in leicht abgeänderter Form auch für den Stamm *B. megaterium* MS941, der im weiteren Verlauf der Arbeit eingesetzt wurde, anwenden.

Es wurden in Zusammenarbeit mit Hollmann drei Hochzelldichtefermentationen im 100 Liter Maßstab durchgeführt, von denen die ersten beiden aufgrund technischer Probleme nur eine Biotrockenmassekonzentration von 10 g/l und 14 g/l erreichten.

In der dritten Fermentation wurde jedoch eine Biotrockenmassekonzentration von 47,5 g/l (Abb. 17) erreicht. Die Batch Phase wurde in 50 Liter Medium durchgeführt und endete bereits nach fünf Stunden. Innerhalb der ersten Fed-Batch Phase konnte nach 32 Stunden Kultivierung nicht mehr ausreichend Sauerstoff ins Medium eingetragen werden, so dass die Zufütterungsrate, und somit die Wachstumsrate, gesenkt werden musste (zweiter Fed-Batch Abschnitt). Dass die realen Wachstumsraten jeweils kleiner als die eingestellten Wachstumsraten waren, hat mit dem verwendeten, exponentiellen Zufütterungsmodell (Gleichung 45) zu tun. Dies berücksichtigt den Erhaltungsstoffwechsel der Bakterien nicht.

$$F = \frac{\mu \cdot X_0 \cdot V_0 \cdot e^{\mu \cdot t}}{S_F \cdot Y_{\frac{X}{S}}}$$

Gleichung 45

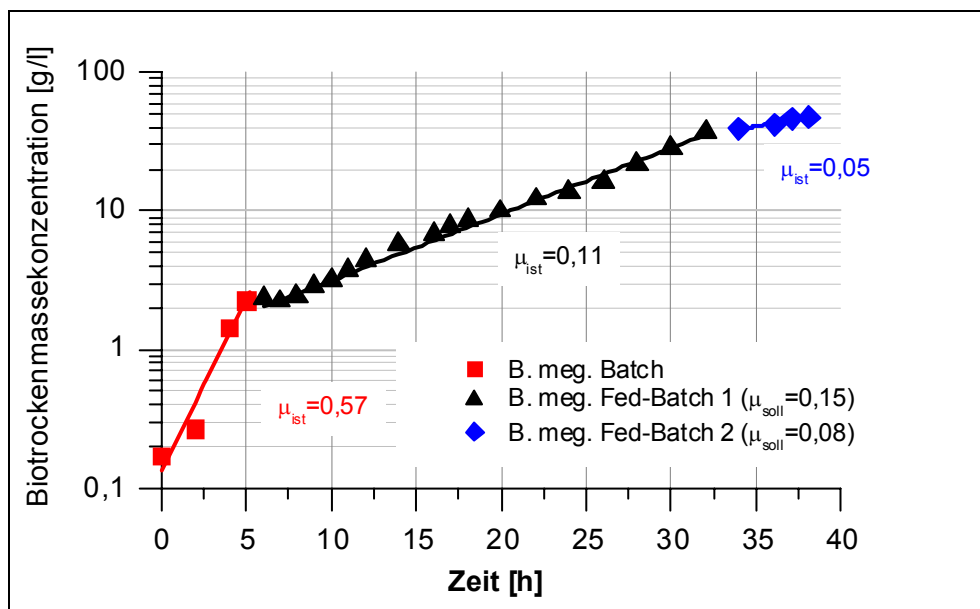


Abb. 17: Darstellung der Fed-Batch Kultivierung von *Bacillus megaterium* MS941

Nach 38 Stunden Kultivierung war es trotz Begasung mit reinem Sauerstoff und gesenkter Zufütterungsrate nicht möglich, ausreichend Sauerstoff ins Medium zu überführen. Aus diesem Grund wurde zu diesem Zeitpunkt geerntet. Die Ernte und Weiterverarbeitung erfolgte analog der von *E. coli* (Kapitel 3.1.1, S. 49).

Medienzusammensetzung zur Anzucht von *B. megaterium*

Die Lösungen 1 - 5 werden steril vereinigt (Angaben pro Liter) und nach dem Beimpfen bei 37°C kultiviert.

Lösung 1

Glucose · 1 H ₂ O	4,4	g
deion. Wasser	500	ml
anschließend autoklavieren		

Material und Methoden

Lösung 2

(NH ₄) ₂ SO ₄	2,0	g
K ₂ HPO ₄	1,0	g
Hefeextrakt	1,0	g
Spurensalzstocklösung	2	ml
deion. Wasser	298	ml
pH Wert auf 7 einstellen		
anschließend autoklavieren		

Lösung 3

MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,3	g
deion. Wasser	195	ml
anschließend autoklavieren		

Lösung 5

Tetracyclin	0,01	g
dest. Wasser	5	ml
anschließend sterilfiltrieren		

Als Antischaummittel wurde bei Bedarf Ucolub hinzugegeben. Bei der dritten Fed-Batch Kultivierung kam auch ein mechanischer Schaumberegner zum Einsatz, der den Einsatz von Antischaummittel jedoch nicht vollständig verhindern konnte.

Zusammensetzung der Spurensalzstocklösung

Stocklösung

CoCl ₂ · 6 H ₂ O	2,5	g/l
MnCl ₂ · 4 H ₂ O	40	g/l
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	53	g/l
FeSO ₄ · 7 H ₂ O	2	g/l
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄	2	g/l

Zusammensetzung der Feed-Lösung

Lösung 1 - 4 werden steril vereinigt und anschließend entsprechend der berechneten Wachstumsrate zugefüttert. Zur Berechnung der Zufütterungsrate wurde ein Ausbeutekoeffizient von $Y_{x/s} = 0,38$ g/g (vgl. Gleichung 45, S. 51) angenommen. Die Angaben beziehen sich auf einen Liter Feed-Lösung.

Lösung 1

Glucose · 1 H ₂ O	110	g
deion. Wasser	500	ml
anschließend autoklavieren		

Lösung 2

(NH ₄) ₂ SO ₄	20	g
K ₂ HPO ₄	5	g
Hefeextrakt	1	g
Spurensalzstocklösung	5	ml
deion. Wasser	395	ml
pH-Wert mit Phosphorsäure auf 4 einstellen um eine Ausfällung zu verhindern.		
anschließend autoklavieren		

Lösung 3

MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,3	g
deion. Wasser	95	ml

anschließend autoklavieren

Lösung 4

Tetracyclin	10	mg
deion. Wasser	5	ml

anschließend sterilfiltrieren

Aufgrund des niedrigen pH-Werts von Lösung 2 kommt es während der Fermentation zu einem erhöhten Laugebedarf, um den pH-Wert im Fermenter konstant bei 7 zu halten.

3.1.3 Biotrockenmassebestimmung

Die Biotrockenmassebestimmung wurde in getrockneten und vorgewogenen 1,5 ml Reaktionsgefäßen durchgeführt. In diese wurde 1 ml Suspension eingefüllt und anschließend 5 min bei 7025 g zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet in 1 ml dest. Wasser resuspendiert. Nach einer zweiten Zentrifugation wurde das Pellet im Trockenschrank bei 105°C über Nacht getrocknet.

3.2 Methoden zur Untersuchung des Zellaufschlusses

Der Zellaufschluss von *E. coli* und *B. megaterium* wurde mit der Rührwerkskugelmühle, dem Hochdruckhomogenisator und dem Ultraschallhomogenisator untersucht. Im Folgenden sollen die Geräte und Methoden beschrieben werden, die zum Zellaufschluss und zur Charakterisierung des Aufschlusserfolgs angewendet wurden.

3.2.1 Eingesetzte Zellaufschlussgeräte

3.2.1.1 Die Rührwerkskugelmühle

Für den Zellaufschluss kam die Rührwerkskugelmühle der Firma Netzsch Modell LME 4 zum Einsatz. Ihr Mahlraumvolumen beträgt 3,826 Liter. In die Mühle wurden 4,65 kg Hartglasperlen (Dichte 2570 kg/m³) der Firma Sigmund Lindner gefüllt. Dies entspricht einem Mahlkörperfüllgrad von $\phi_{MK} = 0,8$. Für *E. coli* und *B. megaterium* wurden verschiedene Mahlkörpergrößen eingesetzt, um die optimale Größe zu bestimmen. Die Umfangsgeschwindigkeit der sechs Rührscheiben betrug bei allen Experimenten 8 m/s (1460 U/min, bei einem Durchmesser von 105 mm).

3.2.1.2 Der Hochdruckhomogenisator

Der eingesetzte Hochdruckhomogenisator der Firma APV/Gaulin Modell Lab60/15-TBSI wurde im Bereich von 100 bis 1000 bar Druckabfall betrieben. Für den Zellaufschluss wurde ein CD (Cell Disruption) Ventil verwandt. Der Volumenstrom betrug etwa 44 Liter pro Stunde. Zur Bestimmung der optimalen Aufschlussparameter von *E. coli* und *B. megaterium* wurden der Druckabfall über dem Ventil und die Anzahl der Beanspruchungsvorgänge variiert.

Material und Methoden

3.2.1.3 Der Ultraschallhomogenisator

Für den Zellaufschluss mittels Ultraschall kamen mehrere Modelle zum Einsatz. Für kleine Volumina wurde der Ultraschallhomogenisator Lapsonic L der Firma Braun eingesetzt. Die Frequenz des Geräts liegt bei 20 kHz. Der Leistungseintrag kann bis zu einem Maximalwert von 200 Watt variiert werden. Um eine Erhitzung zu vermeiden, wurden die Proben (in der Regel 100 ml) in einem Eisbad gekühlt und die Beschallung wurde alle 5 Sekunden für 10 Sekunden unterbrochen. Die Proteinfreisetzung sowie die Enzymaktivität des Enzyms Dextranucrase wurden bei verschiedenen Leistungseinträgen untersucht.

Für größere Volumina (zwei bis drei Liter) wurde der Ultraschallhomogenisator UIP1000 der Firma Dr. Hielscher eingesetzt. Der Aufschluss erfolgte in der Regel unter Rühren bei vollem Leistungseintrag (1000 W) in einem Eisbad. Eine Unterbrechung der Beschallung wie bei der Lapsonic L Sonotrode war nicht möglich, daher wurde darauf geachtet, dass bei der Beschallung die Temperatur nicht über 30°C anstieg. Trotzdem waren die Proteinwerte aus den Ultraschallaufschlüssen im großen Maßstab deutlich geringer als im kleinen. Auch die elektronenmikroskopischen Bilder zeigten, dass in der Suspension noch mehr intakte Zellen vorhanden waren als beim Ultraschallaufschluss im Lapsonic L. Eine Verlängerung der Aufschlusszeit erbrachte hier keinen Erfolg; offensichtlich ist die Energiedichte an der Sonotrode nicht ausreichend, um alle Gram positiven Zellen aufzubrechen.

3.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration (Bradford)

Der Methode nach Bradford [Bradford, 1976] liegt die Farbveränderung des Farbstoffs Coomassie Brilliant-Blau als Folge der Bindung an Aminosäuren zugrunde. Der Farbstoff kann in anionischer (blau), neutraler (grün) sowie kationischer (rot) Form auftreten. Im pH-Bereich des Färbereagens (enthält Phosphorsäure) liegt die kationische Form (rot) vor. Durch die Bindung an basische Aminosäurereste der Eiweiße wird der Farbstoff in seiner anionischen Form (blau, Extinktionsmaximum 595 nm) stabilisiert.

Zusammensetzung des Bradford Reagenz

Stammlösung

Coomassie Blue G-250 (Serva)	300 mg
Methanol	300 ml
Farbstoff im Methanol lösen, anschließend	
ortho-Phosphorsäure	600 ml

Die Stammlösung sollte lichtgeschützt im Kühlschrank gelagert werden.

Gebrauchslösung

150 ml der Stammlösung werden mit dest. Wasser auf 1000 ml aufgefüllt.

Durchführung

Für die Proteinbestimmung wurden die genommenen Proben zunächst bei 13 000 g 45 min zentrifugiert. Zu 100 µl der zu vermessenden Probe wurden anschließend 3 ml der Gebrauchslösung gegeben.

Nach 5-minütiger Inkubationszeit bei Raumtemperatur erfolgte die Extinktionsmessung am UV/VIS-Spektrometer (Du-65, Firma Beckmann) bei 595 nm. Lagen die Werte außerhalb des Kalibrierbereichs, wurde die Probe mit destilliertem Wasser verdünnt und die Messung wurde wiederholt.

Kalibrierung des Bradford Tests

Die Kalibrierung erfolgte mit BSA (Rinderserumalbumin) Standards im Konzentrationsbereich von 0,1 g/l - 0,5 g/l (gelöst in dest. Wasser). Die Kalibrierung wurde parallel zu jeder Messreihe wiederholt.

Diese Bestimmung wird durch einige Reagenzien gestört. Meist werden diese Störungen automatisch durch das Verdünnen der Probe umgangen, aber sie sollten bekannt sein:

Störungen bei mehr als:

SDS	0.02	%
Triton X-100	0.2	%
NaCl	2	M
EDTA	5	mM

3.2.3 Rasterelektronenmikroskopieaufnahmen

Mit dem Rasterelektronenmikroskop wird eine Oberfläche mittels eines fein gebündelten Elektronenstrahls abgetastet. Dies ermöglicht eine deutlich bessere Auflösung als es bei der Lichtmikroskopie möglich ist. Da in der Rasterelektronenmikroskopie nur leitende Oberflächen dargestellt werden können, müssen die Proben speziell präpariert werden. Durch Aufdampfen eines Metallfilms (Besputterung, z. B. mit Gold) werden die Oberflächen der biologischen Präparate leitfähig gemacht. Dabei ist darauf zu achten, dass die Schicht nicht zu dick aufgedampft wird, da sonst die feinen Strukturen des Präparats abgedeckt werden. Da für die ungehinderte Abtastung mit dem Elektronenstrahl Hochvakuum notwendig ist, müssen die Objekte vor dem Bedampfen so präpariert werden, dass sie absolut wasserfrei sind.

Probenpräparation

Von jeder Probe wurden 50 µl - 100 µl Suspension mit Hilfe eines Deckgläschens auf einem Objektträger ausgestrichen und luftgetrocknet, bis die Flüssigkeit, die die Bakterien umgab, verdampft war. Es folgte eine 24-stündige chemische **Fixierung** in mit Glutardialdehyd versetztem Sörensen-Phosphatpuffer, an die sich ein dreimaliges Waschen für 20 min mit reinem Sörensen-Phosphatpuffer anschloss.

Zur **Trocknung** der Präparate durchliefen diese für jeweils 15 Minuten ein Bad in einer ansteigenden Aceton/Wasser-Reihe von 20, 40, 60, 80 und 2x 100 % (v/v) Aceton. Zur Entfernung des Restacetons folgte zum Schluss noch ein 20-minütiges Bad in Hexamethyldisilazan. Nach weiterer 24-stündiger Trocknung im Exsikator wurden die Präparate in kleine Stücke gebrochen und diese wurden mittels eines leitfähigen doppelseitigen Klebebands der Firma Plano auf (mit Aceton entfettete) Messinghalter geklebt. Zur besseren Ableitung der Elektronen wurde der Übergang der Glasränder zu den Messinghaltern noch mit Leitsilber bestrichen.

Material und Methoden

Die **Besputterung** der Proben mit Gold fand für 60 Sekunden bei $2 \cdot 10^{-5}$ bar im 90° Pendelbetrieb in der Besputterungsanlage Z 550 der Firma Leybold-Heraeus statt. Die anschließende Betrachtung und Photographie der Proben erfolgte am Elektronenmikroskop JSM-5400 der Firma Jeol bei einer Proben-Neigung von 0° bis 65° .

Reagenzien zur Elektronenmikroskopie

Sörensen-Phosphatpuffer:

Dinatriumhydrogenphosphatpuffer (0,1 molar)	608	ml
Kaliumdihydrogenphosphatpuffer (0,1 molar)	392	ml

Fixierlösung:

Sörensen-Phosphatpuffer	500	ml
Glutardialdehyd (50 %)	20	ml

3.2.4 Dextransucraseaktivitätstest

Der Stamm *Escherichia coli* TG1 trug das Plasmid pTH275, das ein Gen zur Expression des Enzyms Dextransucrase aus *Streptococcus oralis* (siehe Kapitel 2.3, S. 46) enthielt. Dieses Enzym fiel intrazellulär an und eignete sich daher als Marker für den Aufschlusserfolg.

Durchführung:

In einem 100 ml Erlenmeyerkolben werden 20 ml Puffer 2 vorgelegt. Dazu kommen weitere 20 ml, die aus Enzymlösung und Puffer 1 zusammengesetzt sind. In der Regel werden 1 ml Enzymlösung (mit ca. 5 U/ml) und 19 ml Puffer 1 eingesetzt. Falls mehr Enzymlösung eingesetzt wird, ist eine Kontrolle des pH-Werts notwendig.

Der Erlenmeyerkolben wird bei 30°C im Schüttelwasserbad inkubiert. Über einen Zeitraum von zwei Stunden erfolgt halbstündlich eine Probenahme. Die Proben werden sofort zu der vorgelegten Färbelösung in kleine Reagenzgläser gegeben. Nach fünfminütigem Kochen und anschließender Abkühlung in einem Wasserbad können die Proben mit 5 ml Wasser verdünnt und bei 540 nm im UV/VIS-Spektrometer gemessen werden.

Puffer 1:

Natriumacetat	20	mM, pH 5,2
$\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	50	mg/l

Puffer 2 :

Natriumacetat	20	mM, pH 5,2
$\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	50	mg/l
Saccharose	200	g/l
Puffer 2 nicht autoklavieren oder lagern.		

Färbereagenz zur Monosaccharidquantifizierung:

3,5-Dinitrosalicylsäure	10	g/l
Kaliumnatriumtartrat	300	g/l
Natriumhydroxid	16	g/l

Da sich die Konzentrationen der Inhaltsstoffe nahe der Löslichkeitsgrenze bewegen, ist es notwendig bereits beim Lösen nahezu die gesamte Menge destilliertes Wasser hinzuzugeben.

Kalibrierung des Dextransucraseaktivitätstests

Die Kalibrierung erfolgte mit wässrigen Fruktoselösungen im Konzentrationsbereich von 0 bis 2 g/l. 1 U ist die Menge an Enzym, die in einer Minute ein Mikromol Fruktose bei 30°C und pH 5,2 produziert. Die produzierte Menge Fruktose entspricht der verbrauchten Menge Saccharose.

3.2.5 Messung des Zeta-Potentials

Die Messung des Zeta-Potentials wurde zur Charakterisierung der Zelltrümmer eingesetzt. Die Messungen wurden mit dem Zetasizer Nano ZS ZEN3600 der Firma Malvern Instruments durchgeführt. Dazu wurde die Probe 1:100 mit 50 mM Tris/HCl Puffer pH 7,4 verdünnt und in eine „Zeta Dip Cell“ gegeben. Die Messung erfolgte bei 25°C. Es wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt.

3.2.6 Partikelgrößenverteilung

Die Partikelgrößenanalyse wurde sowohl zur Messung der Zelltrümmer als auch der Adsorbermaterialien genutzt. Sie wurde mit dem Laserbeugungsspektrometer Helos der Firma Sympatec durchgeführt. Die Verdünnung der Proben auf eine Extinktion von 25% erfolgte mit Wasser. Als Messbereiche wurden 0,45 µm bis 87,5 µm (für Zelltrümmer) bzw. 4,5 µm - 875 µm (für Adsorberpartikel) eingestellt. Um die elektrostatischen Wechselwirkungen zu verringern und so der Agglomeration der Zelltrümmer entgegenzuwirken, wurde die Salzkonzentration der Proben mit NaCl auf 1 Mol/l erhöht. Eine vollständige Dispersion der Zelltrümmer konnte jedoch nicht erreicht werden.

3.2.7 Viskositätsmessung

Die Viskosimetrie wurde zur Bestimmung der Viskosität von ganzen und aufgeschlossenen Zellen eingesetzt. Durch die Freisetzung von DNA während des Aufschlussvorgangs kann es zur signifikanten Erhöhung der Viskosität kommen [Anspach et al., 1999].

Zur Messung der Viskosität wurde das Rheometer CVO 120HR der Firma Bohlin eingesetzt. Als Messzelle wurde die C25-Messzelle (Zylinder und Becher) verwandt. Da die Biomasse pseudoplastisches Verhalten zeigte, wurde bei einer konstanten Scherrate von 50 s⁻¹ gemessen. Bei jeder Messung wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt. Sie erfolgte stets möglichst bald nach dem Aufschluss, um einen Abbau der DNA und RNA durch Nucleasen und damit eine Veränderung der Viskosität zu verhindern.

3.3 Methoden zur Aufnahme von Adsorptionsisothermen

Zur Beschreibung der Adsorption wurden Adsorptionsisothermen von einzelnen Proteinen an Ionenaustauschermaterialien angefertigt. Im Fall von BSA (Bovine Serum Albumin) und Peroxidase wurde die konkurrierende Proteinadsorption untersucht.

Material und Methoden

3.3.1 Messung der Adsorptionsisothermen

Die Messung der Adsorptionsisothermen wurde in kleinen Doppelwandbehältern durchgeführt, die mit Hilfe eines Thermostaten auf 20°C temperiert wurden. In Versuchen von Herrmann [Herrmann, 2003] wurde gezeigt, dass die Adsorptionskinetik aufgrund der Filmdiffusion (siehe Kapitel Stofftransportwiderstände, S. 41) von der Rührgeschwindigkeit abhängig ist. Voruntersuchungen haben ergeben, dass eine vollständige Aufwirbelung der Suspension dieses Problem umgehen kann. Aufgrund der Porendiffusion sollte für die Einstellung des Gleichgewichts bei Sepharose Fast Flow Partikeln eine halbe Stunde abgewartet werden. Bei den deutlich größeren Streamline Partikeln verlängerte sich diese Zeit auf eine Stunde. Die Messung der Proteinkonzentration erfolgte über den Bradfordtest (S. 54) oder über den Peroxidaseaktivitätstest (S. 59).

3.3.2 Handhabung des Adsorbermaterials

Zur Equilibrierung des Adsorbermaterials wurde der Adsorber zunächst fünfmal mit dem Puffer, in dem die Adsorption stattfinden sollte, gewaschen. Problematisch ist das genaue Pipettieren eines bestimmten Volumens Adsorbermaterial. Dazu wurde die Suspension in einen Messzylinder gefüllt und die Sedimentation wurde abgewartet. Das Volumen der Schüttung wurde notiert und der Messzylinder bis zum vierfachen Volumen mit Puffer aufgefüllt. Die verdünnte Suspension wurde in ein Becherglas überführt und gerührt. Mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze konnte nun ein bestimmtes Volumen Adsorbervolumen pipettiert werden. Die Angaben, die sich auf das Adsorbervolumen beziehen, berücksichtigen aber lediglich das sedimentierte Volumen des Adsorbers.

3.3.3 Verwendete Proteine

Für die Messung von Adsorptionsisothermen wurden die in Tab. 6 dargestellten Proteine eingesetzt. Aufbauend auf den Untersuchungen von Herrmann [Herrmann, 2003], der die Adsorption an Sepharosepartikeln durchführte, wurden auch Expanded Bed Materialien (Streamline Reihe) der Firma Amersham Biosciences (GE Healthcare) eingesetzt.

Tab. 6: Übersicht über die verwendeten Proteine für Adsorptionsisothermen sowie die eingesetzten Adsorbermaterialien

Enzym	Abk.	Molgewicht	Isoelektrischer Punkt	Adsorbermaterial
Lysozym	LYS	14 kD	11	SP-Sepharose
Ovalbumin	OVA	45 kD	4,6	DEAE-Sepharose
Katalase	CAT	220 kD	5,4	DEAE-Sepharose
Rinderserum-albumin	BSA	67 kD	4,7	DEAE-Sepharose Streamline SP-Sepharose Streamline DEAE-Sepharose
Peroxidase	POD	44 kD	6,5	Streamline SP-Sepharose

Lysozym

Lysozym gehört zu der Gruppe der Hydrolasen (E.C. 3.2.1.17). Es wird aus Hühner-eiweiß gewonnen, kommt aber auch in der menschlichen Tränenflüssigkeit vor. Seinen Namen verdankt das 1922 von A. Flemming entdeckte Enzym seiner Fähigkeit bakterielle Zellwände zu lysieren. So schützt es z.B. das Auge vor Infektionen.

Ovalbumin

Ovalbumin ist der Hauptbestandteil des Proteins in Hühnereiweiß. Es hat sich in der Biochemie zu einem Standard entwickelt.

Katalase

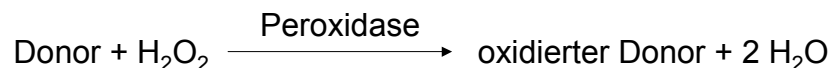
Katalase gehört wie auch die Peroxidase zu den Oxidoreduktasen und ist ebenfalls in den Peroxisomen zu finden. Da beide Enzyme H_2O_2 abbauen können, werden die Namen auch häufig als Synonyme betrachtet.

Rinderserumalbumin

Rinderserumalbumin (BSA) stammt aus dem Blutplasma von Rindern und ist seit vielen Jahren ein Standard in der Biochemie.

Peroxidase

Die Meerrettich - Peroxidase (POD, horseradish peroxidase, E.C - Nummer 1.11.1.7.) ist in der Zelle in Peroxisomen zu finden. Das Enzym ist als H_2O_2 - Konsument im antioxidativen Verteidigungssystem gegen toxische Sauerstoffmetaboliten wirksam. Peroxidase katalysiert die Oxidation eines Wasserstoffdonators durch Wasserstoffperoxid unter Bildung von Wasser.



Als Wasserstoffdonator kommen eine ganze Reihe von verschiedenen Molekülen in Frage. Für den Aktivitätstest wurde ABTS (2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonsäure)diammoniumsalz) eingesetzt.

Aktivitätstest der Peroxidase

Testansatz:

250 µl ABTS (10 g/l)
250 µl Natriumacetatpuffer (20 mM, pH 5)
300 µl Wasserstoffperoxid (0,3%)
200 µl POD-Lösung (etwa 5 mU)

Vor Zugabe der POD-Lösung wurde der Ansatz bei 30°C im Photometer für 5 Minuten inkubiert, um eine Temperaturdrift während der anschließenden Messung bei 405 nm zu vermeiden. Wenn möglich sollte eine Messdauer von mehr als 2 Minuten vermieden werden, da das farbige Produkt der Reaktion nicht stabil ist.

Kalibrierung:

Material und Methoden

Die Kalibrierung des Tests wurde mittels einer Überschussreaktion durchgeführt. Sehr geringe Mengen ABTS wurden mit viel Wasserstoffperoxid in Anwesenheit von viel Peroxidase umgesetzt. Aufgrund des Überschusses an Wasserstoffperoxid wurde von einem vollständigen Umsatz des ABTS ausgegangen. Es ergab sich eine lineare Abhängigkeit zwischen maximaler Extinktion und ABTS-Konzentration:

$$\text{Extinktion} = 39,7 \cdot c_{\text{ABTS}[\text{mmol/l}]} + 0,0058$$

3.4 Methoden der Expanded Bed Untersuchungen

Im Folgenden soll die Expanded Bed Anlage, die zu Beginn der Arbeit aus einzelnen Komponenten aufgebaut und in Betrieb genommen wurde, erläutert werden. Anschließend wird auf die Messung von Verweilzeitverteilungen eingegangen, wobei die praktische Messung und Berechnung der Bodensteinzahl im Vordergrund steht.

3.4.1 Aufbau der Expanded Bed Anlage

Die Expanded Bed Anlage wurde aus einzelnen Geräten aufgebaut (siehe im Anhang Tab. 12, S. 105, und Abb. 47, S. 106). Ein Fließbild der Anlage zeigt Abb. 18.

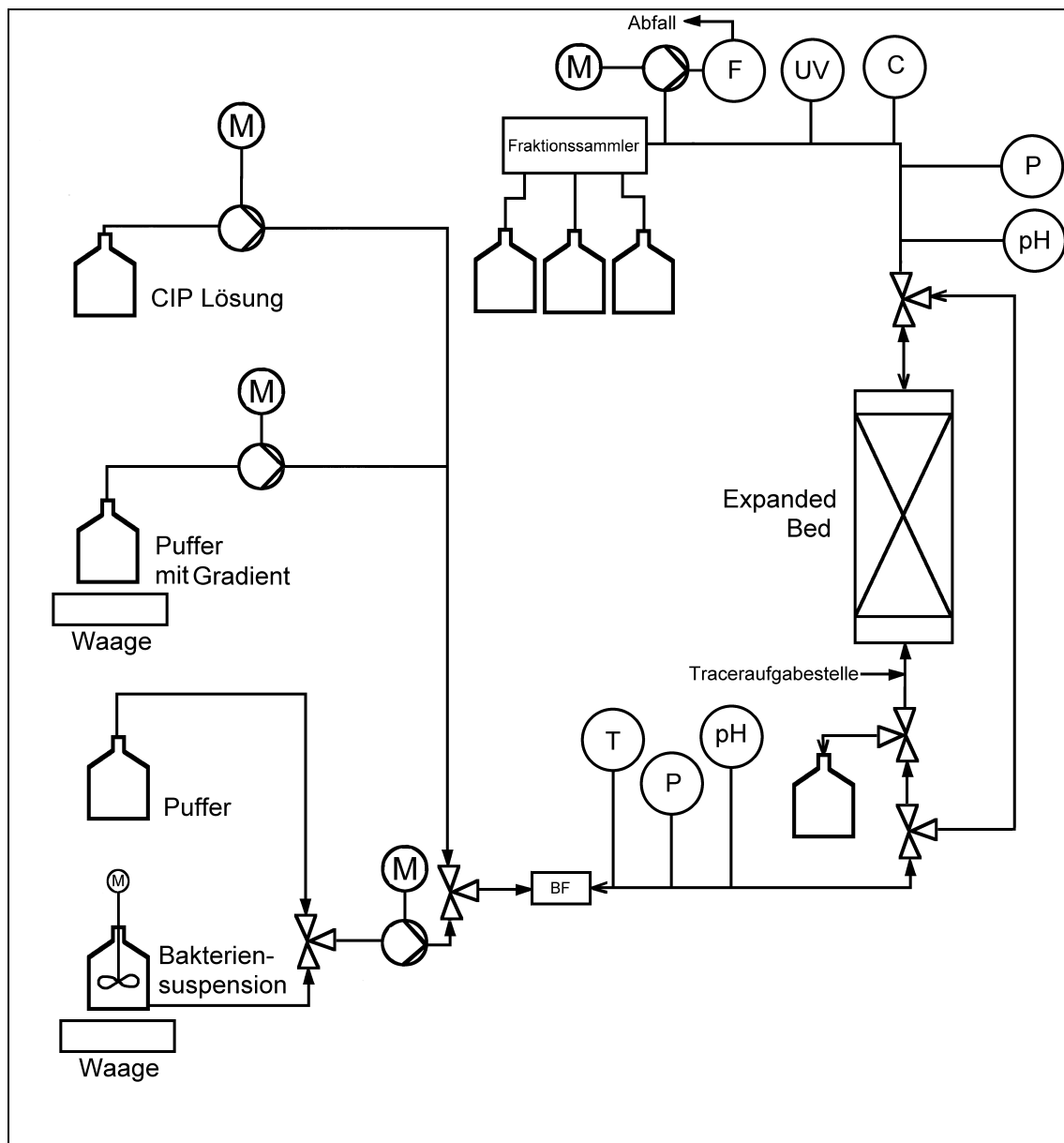


Abb. 18: Fließbild der Expanded Bed Anlage; BF: Blasenfalle;
Sensoren: T: Temperatur; P: Druck; pH: pH-Wert; F: Fluoreszenz;
C: Leitfähigkeit; UV: Photometer

Material und Methoden

Zur pulsationsfreien Förderung des Puffers bzw. der Suspension wurde eine Zahnradpumpe (unten in Abb. 18) eingesetzt. Der Durchfluss wurde mittels Waagen bestimmt, auf denen die Vorratsbehälter standen, deren Durchfluss gemessen werden sollte. Zwei Schlauchpumpen ermöglichten bei der Elution einen Gradienten. Die beiden Messzellen ober- und unterhalb der Säule (Eigenkonstruktionen) enthielten einige Sensoren, um den Verlauf der verschiedenen Versuche zu verfolgen. Vor dem Fraktionssammler, der die Aufteilung des Volumenstroms in bis zu 27 Flaschen (je 250 ml) ermöglichte, durchfloss das Medium noch einen UV-Detektor (dessen Messzelle eine Eigenkonstruktion war) und mit einem Teilstrom einen Fluoreszenzdetektor.

Für die Versuche mit der Expanded Bed Anlage wurden zwei Säulen eingesetzt. Neben der Streamline 25 Säule (mit hydraulischem Stempel) der Firma Amersham Biosciences (GE Healthcare) wurde eine Eigenkonstruktion mit 50 mm Durchmesser und 1 m Höhe verwandt. Die Eigenkonstruktion verfügte über zehn Probenahmestellen in unterschiedlicher Höhe. Unterhalb des Siebs diente eine Kugelschüttung aus Glaskugeln mit 4 mm Durchmesser als Strömungsverteiler. Wahlweise konnte auch eine Lochplatte als Strömungsverteiler eingesetzt werden. Ein Dreifuß ermöglichte die vertikale Ausrichtung der Säule.

Um die Scherkräfte auf die Zelltrümmer und den Druckverlust möglichst gering zu halten, wurde bei der Verbindung der einzelnen Geräte stets auf einen konstanten Schlauchinnendurchmesser von 4 mm geachtet. Aufgrund der aggressiven CIP-Prozedur (vgl. Kapitel 3.4.3.3, S. 68) war eine chemische Beständigkeit gegen Natronlauge und Alkohol für alle Oberflächen, die mit dem Medium in Kontakt kamen, notwendig. Als Schlauchmaterial wurde Teflon gewählt. Auch die Ventile waren innen mit Teflon beschichtet. Für die institutsintern gefertigten Teile wurde entweder Polypropylen (oberer und unterer Adapter der Expanded Bed Säule, Messzellen) oder Edelstahl (UV-Messzelle, Auslass Fraktionssammler) eingesetzt.

3.4.2 Programm zur Messwerterfassung und Regelung der Anlage

Zum Betreiben der Anlage wurde ein Programm mit der grafischen Programmiersprache LabView erstellt. Es verfügte über folgende Möglichkeiten:

- Bedienelemente und Anzeigen für die Anlage

Die Oberfläche des Programms ermöglichte die Bedienung der einzelnen Elemente der Anlage. Hier konnten der gewünschte Durchfluss und der Behälter, aus dem gefördert werden sollte, ausgewählt werden. Der Durchfluss wurde automatisch in die Fluidgeschwindigkeit in der Säule umgerechnet. Daneben wurden grafisch der Durchfluss (sämtlicher Behälter sowie Soll-Durchfluss) und der Druckverlust über die Zeit dargestellt. In einem variablen Diagramm ließen sich alle Messwerte einzeln auswählen und über der Zeit darstellen. Zur Entlastung des Arbeitsspeichers wurden nicht mehr als 1000 Werte online dargestellt. Auf Knopfdruck wurden die Daten des Gesamtverlaufs aber für die ausgewählten Messwerte geladen und in einem separaten Fenster angezeigt.

- Messwerterfassung

Die Messwerterfassung zeichnete neben den Messwerten für Leitfähigkeit, UV-Adsorption, Temperatur, Druck (oben und unten), Fluoreszenz und Waagensignale (beide Waagen) auch die Zeit, den Solldurchfluss, die Signale an die Pumpen, die Behälterauswahl, den Stand des Fraktionssammlers, der Rückspülung und der Regelung auf. Bei Bedarf wurden die elektrischen Signale automatisch in physikalische Werte umgerechnet. Das Intervall der Messwerterfassung konnte von der Bedienoberfläche aus variiert werden, wurde aber in den meisten Fällen auf 1 Hz gesetzt. Aufgrund der vielen Messwerte wurde eine Entlastung des Arbeitsspeichers unumgänglich, so dass bei mehr als 1000 Messwerterfassungsschleifen die ersten 500 Messwerte in eine temporäre Datei gespeichert wurden. Bei Beendigung des Programms wurden alle Daten der temporären Datei geladen und mit den Daten im Arbeitsspeicher zusammen abgespeichert.

- Regelung des Durchflusses

Die Anzahl der Messwerte, die zwischen zwei Regelungsschritten aufgenommen werden sollten, konnte variiert werden. Die Grundeinstellung betrug 30. Es wurde stets darauf geachtet, dass zwischen zwei Regelungsschritten mindestens 10 ml gefördert wurden. Zur Regelung der Pumpen wurde zunächst der aktuelle Durchfluss mittels linearer Regression aus den Waagenmesswerten und der Zeit bestimmt. Da der Durchfluss vom Druckverlust und dieser wiederum von der Bettexpansion abhängig war, wurde lediglich die zweite Hälfte der Messwerte analysiert, um die fehlerhaften Werte, die während der Expansion des Betts entstanden, nicht zu berücksichtigen. Anschließend erfolgte eine lineare Regression aus allen Durchfluss/Pumpensignal Messwerten. Mit Hilfe dieser Geradengleichung wurde dann das neue Pumpensignal berechnet, das zum Erreichen des Solldurchflusses notwendig war. Im Bereich um ± 4 ml/min des Solldurchflusses wurde auf eine Festwertregelung umgeschaltet. Nur in Abhängigkeit von der Abweichung zum Solldurchfluss wurde mittels einer Exponentialfunktion das neue Pumpensignal berechnet.

- Rückspülung

Ein Knopf auf der Bedienoberfläche ermöglichte unabhängig von der jeweiligen Behälterauswahl die Rückspülung der Säule (z.B. für den Fall, dass das Sieb des unteren Säulenadapters verstopft war).

- Steuerung des Fraktionssammlers

Der Fraktionssammler konnte manuell oder zeitgesteuert angesprochen werden.

- Gradient

Das Programm ermöglichte es, die Inhalte von zwei Vorratsflaschen entsprechend einer prozentualen Angabe zu mischen und dieses Mischungsverhältnis

Material und Methoden

über einen bestimmten Zeitraum zu variieren. Auf diese Weise konnte ein Gradient von zwei verschiedenen Lösungen realisiert werden.

- Automatisierte CIP-Prozedur

Um die Reinigung über Nacht ablaufen zu lassen, konnte eine CIP-Prozedur (Cleaning in Place) automatisch abgearbeitet werden. Für eine vorgegebene Zeit wurde CIP-Lösung mit einem vorgegebenen Durchfluss durch die Säule gepumpt. Anschließend erfolgte ein Waschen mit Puffer (ebenfalls mit wählbaren Parametern). Zum Abschluss wurde die Anlage vom Programm auf Kreislauf und die Regelung auf Pause gestellt.

- Bodensteinzahl

Das Programm ermöglichte die automatische Berechnung der Bodensteinzahl aus beliebigen Messwerten (in der Regel UV-Adsorption oder Fluoreszenz) während des Versuchs. Dies war zur Kontrolle der Vormessungen notwendig, da eine Unterbrechung des Programms eine Veränderung des Durchflusses mit sich gebracht hätte. Ferner verfügte das Programm über eine automatische Korrektur bei schiefer Grundlinie. Die berechneten Werte der Verweilzeitverteilung (Θ sowie $E(\Theta)$, vgl. S. 33) konnten abgespeichert werden.

3.4.3 Durchführung der Verweilzeitmessungen

Zum Betreiben der Anlage wurde zunächst aus den Vorratsbehältern (die je nach Bedarf auf den zwei Waagen standen) Puffer durch die Anlage gepumpt, um das Bett zu expandieren und zu equilibrieren. Die Messungen erfolgten bei einer Leerrohrgeschwindigkeit von 200 cm/h bis 300 cm/h. Die gemessenen Verweilzeitverteilungen waren sehr sensibel gegenüber Störungen. Insbesondere war es wichtig, dass die Säule senkrecht ausgerichtet war und dass im Sieb über dem Strömungsverteiler keine Adsorberpartikel eingeklemmt waren. Auch das Adsorbermaterial selbst neigte bei bestimmten pH-Werten zur Bildung lockerer Agglomerate, was sich in der Ausbildung von Strömungskanälen äußerte. Zur Kontrolle wurde daher vor jeder Verweilzeitmessung mit Zellbrühe eine Messung in reinem Puffer durchgeführt. Erst wenn diese Vormessung eine Bodensteinzahl von über 40 ergab, wurde eine Messung in Zellbrühe vorgenommen. Dazu wurde der Tracer 20 Minuten nach Umstellung des Mediums von Puffer auf Zellbrühe direkt unterhalb der Säule eingespritzt. Diese Zeit war notwendig, um das Signal des Fluoreszenzdetektors auf einen auswertbaren, konstanten Wert zu bringen. Ferner musste in dieser Zeit die Stempelhöhe (ca. 2 cm über der fluidisierten Schicht) an die expandierende Betthöhe angepasst werden. Messungen zeigten, dass längere Wartezeiten zu höheren Bodensteinzahlen führten. Dies ist auf eine Absättigung der Bindungsstellen des Adsorbers durch Zelltrümmer zurückzuführen. Durch die Absättigung bilden sich keine neuen Adsorberpartikelagglomerate, die aufgrund ihrer Wanderung zum Fuß des Expanded Beds die Verweilzeitverteilung stören. Kürzere Wartezeiten als 20 Minuten führten zu nicht auswertbaren Ergebnissen. Zur Veranschaulichung ist in Abb. 19 der zeitliche Verlauf einer Messung dargestellt.

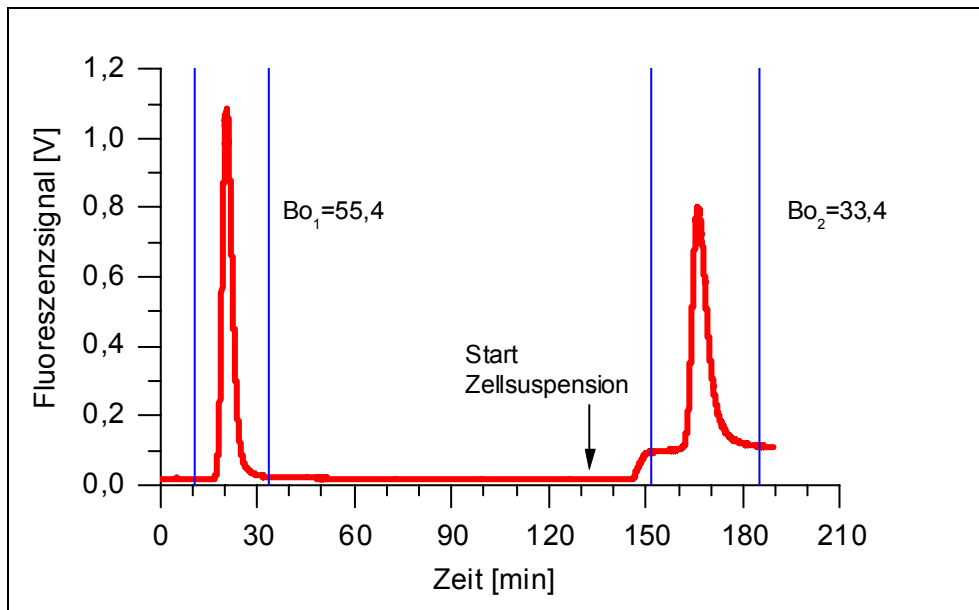


Abb. 19: Beispiel einer typischen Verweilzeitbestimmung: Die Grenzen, in denen die Bodensteinzahlen bestimmt wurden, sind blau markiert.
 Tris/HCl-Puffer pH 7,4; *B. meg.* $c_{\text{BTM}} = 20 \text{ g/l}$, $u_0 = 300 \text{ cm/h}$, $d_c = 2,5 \text{ cm}$

3.4.3.1 Tracerauswahl

Zur Messung des Verweilzeitverhaltens wurden unterschiedliche Signalstoffe (Tracer) getestet. Zunächst wurde das Aufbringen einer Stufenfunktion durch Umschalten der Behälterwahl untersucht. Es zeigte sich jedoch, dass diese Vorgehensweise abhängig von der Behälterreihenfolge war. Der Grund dafür waren Dichteunterschiede. Stellte die dichtere Lösung die Unterphase, so zeigten die Ergebnisse eine Pfropfenströmung. Wenn die dichtere Phase in der Oberphase war, ergaben die Messungen sehr breite Verweilzeitverteilungen. Selbst ein Temperaturunterschied von $0,1^\circ\text{C}$ zeigte noch deutliche Unterschiede in der Verweilzeit. Ein unterschiedlicher pH-Wert in den Lösungen führte zwar zu schmalen Verweilzeitverteilungen, doch bei Zugabe eines pH-Indikators zeigte sich, dass dies auf Neutralisationseffekten beruhte.

Aus diesem Grund wurden für die Messung der Verweilzeit Stoßmarkierungen mit Signalstoffen durchgeführt (siehe Tab. 7). Die Markierungen im UV-Bereich (z.B. mit Aceton) waren nicht für Messungen mit Zellbrühe geeignet, da diese selbst eine sehr hohe Extinktion zeigte. Bei den Fluoreszenzfarbstoffen musste z.T. eine andere Wellenlänge als die für den Tracer optimale gewählt werden, da die Zellbrühe bei Eingangswellenlängen über 540 nm selbst starke Fluoreszenz aufwies. Zur Vermeidung der Überschneidung von Signalen aus dem Signalstoff und der Zellbrühe haben sich auch Ionenselektive Elektroden bewährt [Fernandez-Lahore et al., 2001]. In dieser Arbeit wurde bei Messungen in Anwesenheit des Adsorbermaterials DEAE-Sepharose Rhodamin B verwandt. In Anwesenheit von SP-Sepharose wurde Fluorescein eingesetzt.

Material und Methoden

Tab. 7: Übersicht über die getesteten Fluoreszenzsignalstoffe

Tracer ($C_{\text{Tracer}}/V_{\text{Tracer}}$)	Wellenlängen $\lambda_{\text{in}}/\lambda_{\text{out}}$ [nm]	Eignung
Tryptophan	240/740	Das im biologischen Material enthaltene Tryptophan stört die Messung
Fluorescein	480/570	Geeignet für Kationenaustauscher im neutralen bis sauren Bereich, bindet an Anionenaustauscher im neutralen Bereich
Pyren	317/390	Nahezu unlöslich in Wasser, durch die Verdünnung bei der Messung wurden die Signale zu schwach.
Phtalocyanin (Porphyrin)	350/700	Adsorbierte am Anionenaustauscher
Rhodamin B 0,1 g/l / 1,5 ml	530/590	Zeigt sowohl gute Fluoreszenz als auch UV-Adsorption. Ferner kann die Messung aufgrund der Violettfärbung des Mediums gut verfolgt werden. Geeignet für Anionenaustauscher im neutralen Bereich, die Messung erfolgt aufgrund starker Fluoreszenz der Zellbrühe jenseits der optimalen Wellenlänge (540/590).

3.4.3.2 Berechnung der Bodensteinzahl

Die praktische Berechnung der Bodensteinzahl erfolgte in der Regel über das UV- bzw. das Fluoreszenzsignal. Als Basis für die Berechnungen wurde das Modell eines beidseitig geschlossenen Strömungsrohrs zugrundegelegt. Levenspiel [Levenspiel, 1999] gibt für die Berechnung der Bodensteinzahl folgende Zusammenhänge an:

$$\sigma_{\tau}^2 = \frac{\sigma^2}{\tau^2} = \frac{2}{Bo} - \frac{2}{Bo^2} \cdot [1 - e^{-Bo}] \quad \text{Gleichung 46}$$

Ferner gibt Levenspiel für die Berechnung der Varianz folgende Formel an:

$$\sigma^2 = \frac{\sum t_i^2 c_i}{\sum c_i} - \tau^2 \quad \text{Gleichung 47}$$

Die mittlere Verweilzeit kann wie folgt berechnet werden:

$$\tau = \frac{\sum t_i c_i}{\sum c_i} \quad \text{Gleichung 48}$$

Durch Einsetzen von

$$A = \sum c_i \quad B = \sum t_i \cdot c_i \quad C = \sum t_i^2 \cdot c_i$$

kann für die Varianz um den Mittelwert folgende Formel angegeben werden:

$$\sigma_{\tau}^2 = \frac{\sigma^2}{\tau^2} = \frac{AC - B^2}{A^2} \cdot \left(\frac{A}{B}\right)^2 = \frac{AC - B^2}{B^2} \quad \text{Gleichung 49}$$

Gleichung 46 lässt sich nicht nach der Bodensteinzahl auflösen. Aus diesem Grund wurde die Bodensteinzahl mit Hilfe eines Computerprogramms iterativ bestimmt. Die Variation der Bodensteinzahl wurde so lange fortgesetzt, bis das Ergebnis von Gleichung 46 auf vier Stellen nach dem Komma mit dem Ergebnis von Gleichung 49 überein stimmte.

Als Ausgangswert für die iterative Berechnung der Bodensteinzahl des beidseitig geschlossenen Reaktors wurde die Bodensteinzahl des beidseitig offenen Reaktors verwandt. Für die Berechnung gibt [Levenspiel, 1999] folgende Formel an:

$$\sigma_{\tau}^2 = \frac{\sigma^2}{\tau^2} = \frac{2}{Bo} + \frac{8}{Bo^2} \quad \text{Gleichung 50}$$

Daraus folgt durch Auflösung der quadratischen Gleichung bei Einsatz der pq-Formel:

$$Bo_{1,2} = +\frac{1}{\sigma_{\tau}^2} \pm \sqrt{\left(-\frac{1}{\sigma_{\tau}^2}\right)^2 + \frac{8}{\sigma_{\tau}^2}} \quad \text{Gleichung 51}$$

Da die Subtraktion der Wurzel zu negativen Bodensteinzahlen führt, diese aber minimal den Wert 0 annehmen kann, wird die Bodensteinzahl eindeutig durch die Addition der Wurzel bestimmt.

Durch Einsetzen von Gleichung 49 in Gleichung 51 ergibt sich die Formel für die Berechnung der Bodensteinzahl im beidseitig offenen Reaktor:

$$Bo = \frac{B^2}{AC - B^2} + \sqrt{\left(-\frac{B^2}{AC - B^2}\right)^2 + \frac{8B^2}{AC - B^2}} \quad \text{Gleichung 52}$$

Da es für die Bodensteinzahl entscheidend ist, über welchen Zeitraum die Werte berücksichtigt werden, wurden die Daten mit einem Programm (erstellt in LabView) nach festen Regeln ausgewertet. Die Messung der Verweilzeitverteilung erfolgte stets vom Zeitpunkt der Signalstoffaufgabe bis zu einer reduzierten Verweilzeit von 2,5 (siehe Bereich zwischen den blauen Linien in Abb. 19, S. 65). Bei den Messungen in Zelltrümmersuspension stieg jedoch die Grundlinie während der Messung noch geringfügig an. Diese Abweichung wurde als linear angenommen und korrigiert, indem mit den Mittelwerten der ersten und letzten 100 Messwerte eine Gradengleichung erstellt wurde.

Material und Methoden

3.4.3.3 Reinigungsverfahren (CIP-Prozedur)

Nach jeder Messung mit Zellbrühe erfolgte eine Reinigung des Adsorbermaterials. Dazu wurde die Säule mit mindestens drei Säulenvolumina 1 M Natriumchloridlösung zur Destabilisierung adsorbierter Moleküle am Adsorber gespült. Anschließend erfolgte eine Reinigung mit CIP-Lösung (1M NaCl, 0,5 M NaOH) für vier Stunden bei einem Durchfluss von 10 ml/min. Weitere zwei Stunden wurde das Adsorbermaterial mit Puffer (je nach Bedarf) wieder equilibriert.

Eine ungenügende Menge Natriumchloridlösung zog eine Braunfärbung des Adsorbermaterials während der Behandlung mit CIP-Lösung nach sich. Diese konnte durch den Einsatz einer Ethanol (20%) / Essigsäure (20%) / Wasser (60%) (V/V/V) Mischung wieder entfernt werden. Leider neigte das Adsorbermaterial nach dieser Behandlung zur Flockenbildung.

4 Ergebnisse und Diskussion

Im Folgendem werden zunächst die Ergebnisse des Zellaufschlusses, der Adsorptionstests und der Fluidodynamik des Expanded Beds vorgestellt. Abschließend erfolgt die Beschreibung der Fluidodynamik des Expanded Beds in Anwesenheit von Zelltrümmern.

4.1 Untersuchung des Zellaufschlusses

Der Zellaufschluss wurde an dem Gram positiven Bakterium *Bacillus megaterium* sowie am Gram negativen Bakterium *Escherischia coli* untersucht. Beide Organismen wurden in der Rührwerkskugelmühle, dem Hochdruckhomogenisator und dem Ultraschallhomogenisator unter Variation der Aufschlussparameter beansprucht. Das Ziel dieser Untersuchungen war es, zum einen die optimalen Aufschlussparameter zu ermitteln und zum anderen festzustellen, ob die unterschiedlichen Aufschlussmethoden unterschiedliche Zelltrümmerformen und -größen zur Folge hatten.

4.1.1 Zellaufschluss von *B. megaterium* in der Rührwerkskugelmühle

Der Organismus *Bacillus megaterium* WH320 wurde in der Rührwerkskugelmühle mit unterschiedlich großen Mahlkörpern beansprucht (Abb. 20).

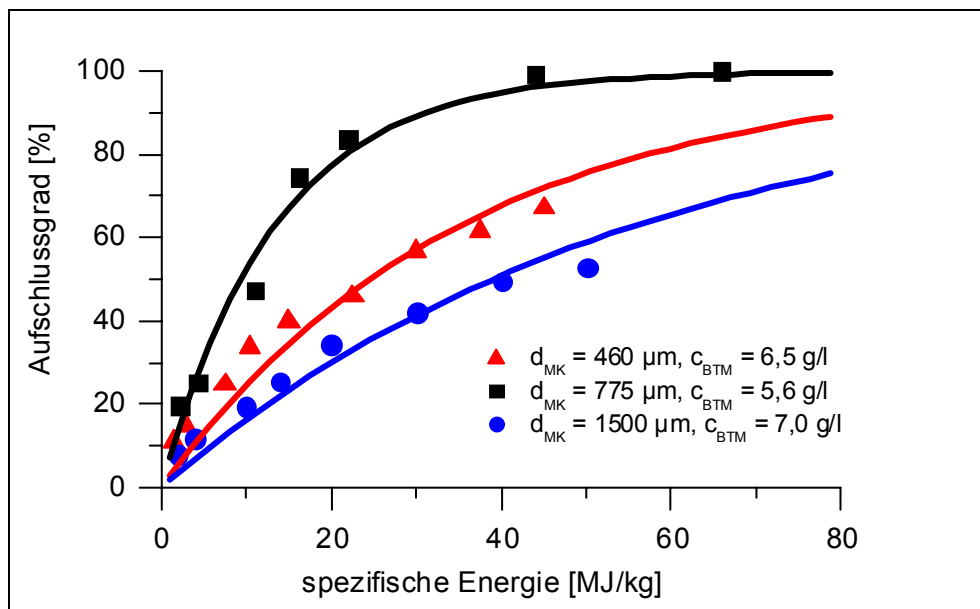


Abb. 20: Zellaufschluss von *B. megaterium* in der Rührwerkskugelmühle mit unterschiedlichen Mahlkörperdurchmessern, $v_t = 8 \text{ m/s}$, Kurven nach Reaktion 1. Ordnung (Gleichung 14) angepasst.

Die Umfangsgeschwindigkeit der Rührscheiben (v_t) wurde konstant bei 8 m/s gehalten. Beim Einsatz von Mahlkörpern der Größen 460 µm, 775 µm und 1500 µm wurde das beste Aufschlussresultat mit der mittleren Mahlkörpergröße erreicht. Ein ausgeprägtes Optimum der Mahlkörpergröße ist ein bekanntes Phänomen (siehe S. 20).

Ergebnisse und Diskussion

Die hohen spezifischen Energieeinträge sind auf die geringen Biotrockenmassekonzentrationen bei der Durchführung der Versuche zurückzuführen. Sie liegen zwischen 5,6 g/l und 7 g/l. Ausreichende Mengen an Versuchsmaterial konnten erst nach Etablierung der Hochzelldichtefermentation zur Verfügung gestellt werden. Versuche mit Hefe haben ergeben, dass die Trockenmasse erst ab einem Gehalt von etwa 20% keinen Einfluss mehr auf die Aufschlusseffizienz hat [Bunge, 1991]. Dies hängt damit zusammen, dass nur bei hohen Biomassekonzentrationen sichergestellt werden kann, dass nahezu bei jedem Mahlkörperkontakt Biomasse eingefangen und aufgeschlossen wird.

Die Zelltrümmer von *B. megaterium*, die beim Zellaufschluss in der Rührwerkskugelmühle entstehen, sind in Abb. 21 zu sehen. Dieses Foto wurde nach einem Versuch aufgenommen, der mit 20 g/l Biotrockenmasse durchgeführt wurde. Da der spezifische Energieeintrag auf die Biotrockenmasse bezogen wird, liegt dieser Wert lediglich bei 5,4 MJ/kg. Der Aufschlussgrad betrug etwa 90 %. Die Zelltrümmer zeigen keine definierte Form und neigen zur Agglomeration. Aufgrund der Agglomerationsneigung zeigte sich bei der Partikelgrößenanalyse nur zu Beginn des Versuchs eine Abnahme des mittleren Partikeldurchmessers. Bei fortschreitender Zerkleinerung übertraf der gemessene Wert sogar den Anfangswert. Dieser Verlauf wird durch die elektronenmikroskopischen Aufnahmen gestützt.

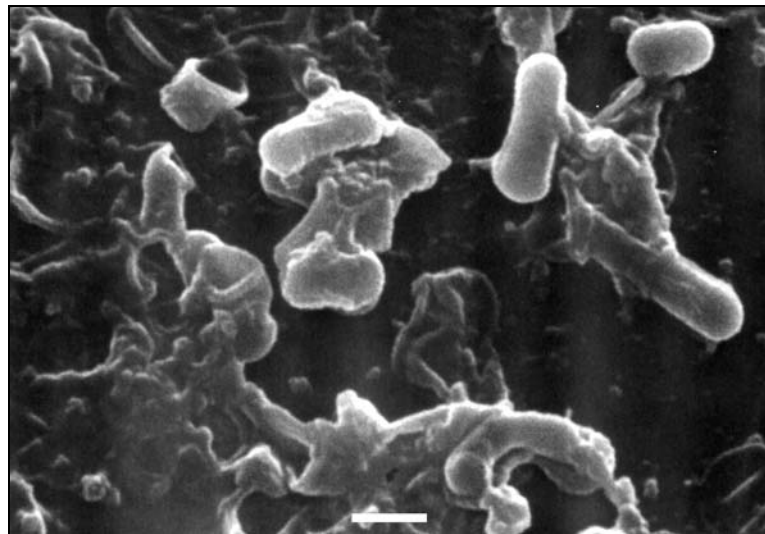


Abb. 21: *B. megaterium* nach 30 min Zellaufschluss in der Rührwerkskugelmühle, $c_{BTM} = 20 \text{ g/l}$; $v_t = 8 \text{ m/s}$; $d_{MK} = 775 \text{ }\mu\text{m}$; $E_{spez} = 5,4 \text{ MJ/kg}$; Maßstab: $1 \text{ }\mu\text{m}$

4.1.2 Zellaufschluss von *B. megaterium* im Hochdruckhomogenisator

Ein entscheidender Parameter des Zellaufschlusses im Hochdruckhomogenisator ist der Druckabfall über das Homogenisierventil. *B. megaterium* wurde bei 200 bar, 400 bar und 600 bar Druckabfall aufgeschlossen. Bei jeder Einstellung wurde die Suspension mehrfach durch das Gerät geschickt, so dass Zellen, die im ersten Durchlauf nicht zerkleinert wurden, ebenfalls aufgeschlossen wurden.

Ergebnisse und Diskussion

Der Zusammenhang zwischen eingetragener spezifischer Energie und dem Aufschlussgrad ist in Abb. 22 dargestellt.

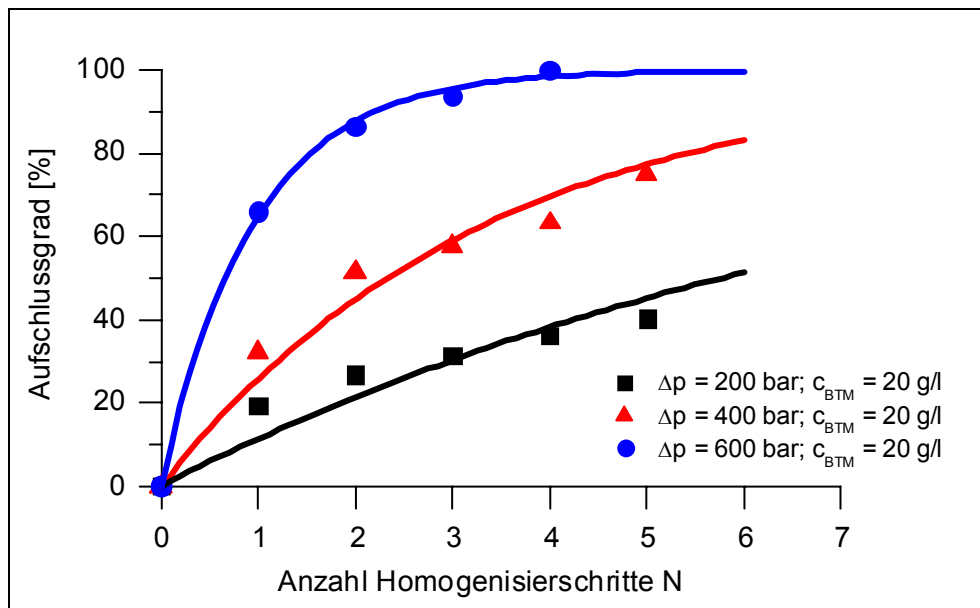


Abb. 22: Zellaufschluss von *B. megaterium* im Hochdruckhomogenisator bei unterschiedlichen Druckabfall; Kurven nach Hetherington (Gleichung 3) angepasst

Die Messpunkte wurden nach Hetherington (Gleichung 3, S. 16) angepasst. Es ist allerdings zu erwähnen, dass die Parameter k_1 und a abhängig vom Druck unterschiedliche Werte annehmen. Zur Vorhersage des Aufschlussgrades bei anderen Drücken ist diese Gleichung demnach nur bedingt geeignet.

Tab. 8: Parameter nach Hetherington

Parameter	$\Delta p = 200 \cdot 10^5 \text{ Pa}$	$\Delta p = 400 \cdot 10^5 \text{ Pa}$	$\Delta p = 600 \cdot 10^5 \text{ Pa}$
k_1	0,00406	0,00633	0,0088
a	0,20165	0,21999	0,26679

Die Auftragung des Aufschlussgrads über dem spezifischen Energieeintrag ist in Abb. 23 dargestellt. Bei gleichem spezifischen Energieeintrag liegt der Aufschlussgrad bei einem Druckabfall über dem Homogenisierventil von 200 bar deutlich niedriger als bei den anderen Versuchsreihen. Dies hängt mit der Zunahme der Kavitationsereignisse bei höherem Druckabfall zusammen.

Ergebnisse und Diskussion

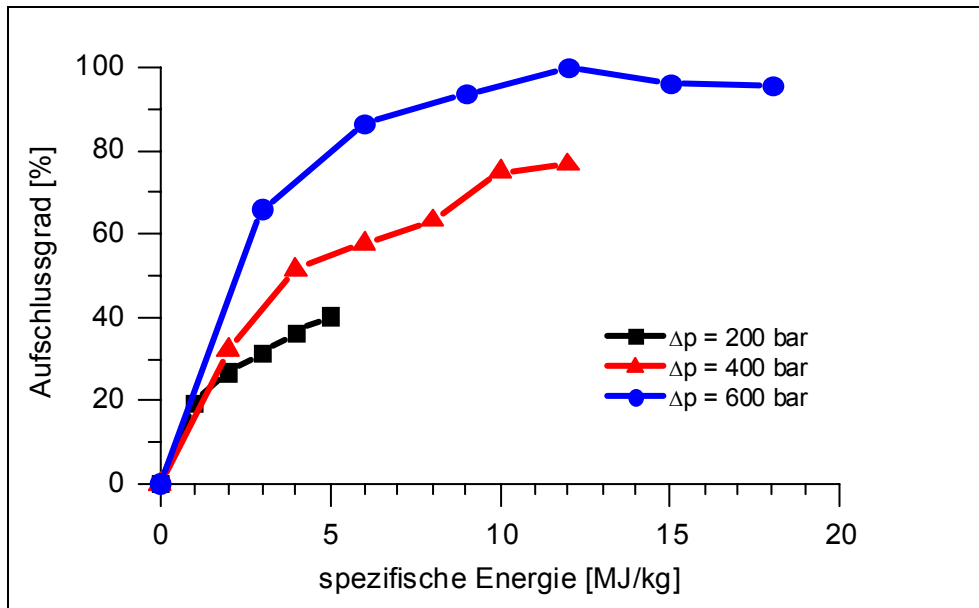


Abb. 23: Zellaufschluss von *B. megaterium* im Hochdruckhomogenisator bei unterschiedlichen Druckabfall, aufgetragen über den spezifischen Energieeintrag. $c_{\text{BTM}} = 20$ g/l

Die Zelltrümmer von *B. megaterium* nach dem Aufschluss mit dem Hochdruckhomogenisator haben die Form von Ringen und Kappen (Abb. 24). Würde die Zellwand überall die gleiche Festigkeit haben, so müsste die Zelle der Länge nach platzen, da die Spannungen, die auf die Zellwand wirken, aufgrund der Rundung in Umfangsrichtung deutlich höher sind. Die Mureinschicht von Bakterien ist jedoch anisotrop aufgebaut (vergleiche Kapitel 2.1.1.1, S. 4). Die quer zur Längsachse der Bakterien angeordneten Heteropolymere sind bedeutend fester als die parallel zur Längsachse angeordneten Peptidbrücken. Ferner gibt es bei Bakterien Wachstumsbänder in der Zellwand, an denen die Mureinschicht durch das Enzym Autolysozym geschwächt ist, um ein Längenwachstum der Zelle zu ermöglichen. An diesen Bändern kommt es bevorzugt zum Bruch der Zellwand.

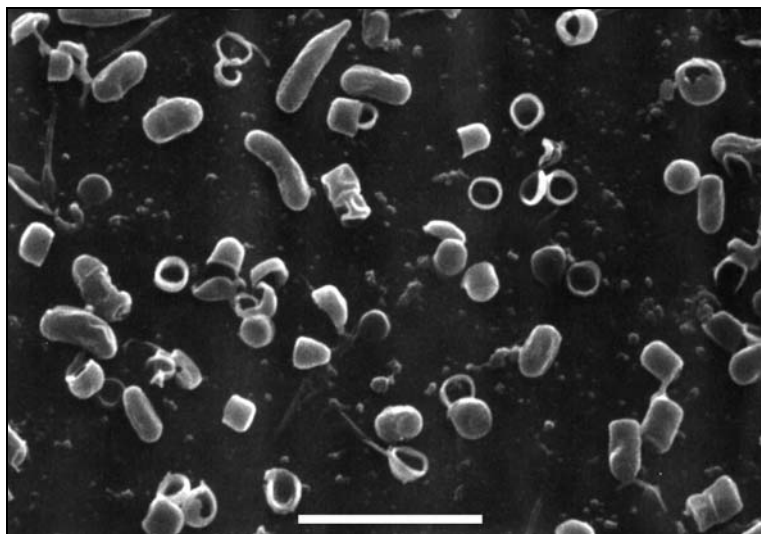


Abb. 24: *B. megaterium* nach 5 Durchgängen im Hochdruckhomogenisator $\Delta p = 400$ bar, $c_{\text{BTM}} = 20$ g/l; $E_{\text{spez}} = 10$ MJ/kg; Maßstab: 5 μm

Die Tatsache, dass die Zellhüllen in mehrere Teile zerfallen sind, lässt darauf schließen, dass der Aufschluss hauptsächlich auf Scherung durch das umgebende Medium (im Spalt oder bei der Beanspruchung am Prallring) und nicht auf Kavitationseignisse zurückzuführen ist. Dies wird besonders im Vergleich zu den Zelltrümmern aus dem Ultraschallhomogenisator deutlich, da dort der Aufschluss nahezu ausschließlich auf Kavitation basiert.

4.1.3 Zellaufschluss von *B. megaterium* im Ultraschallhomogenisator

Der Zellaufschluss im Ultraschallhomogenisator wurde bei einem Energieeintrag von 200 Watt und einer Frequenz von 20 kHz in 400 ml Zellsuspension durchgeführt. Auch mit diesem Verfahren konnte ein Aufschlussgrad von 100% erreicht werden (Abb. 25). Aufgrund des vergleichsweise hohen Energieeintrags musste besonders auf die Kühlung der Suspension geachtet werden.

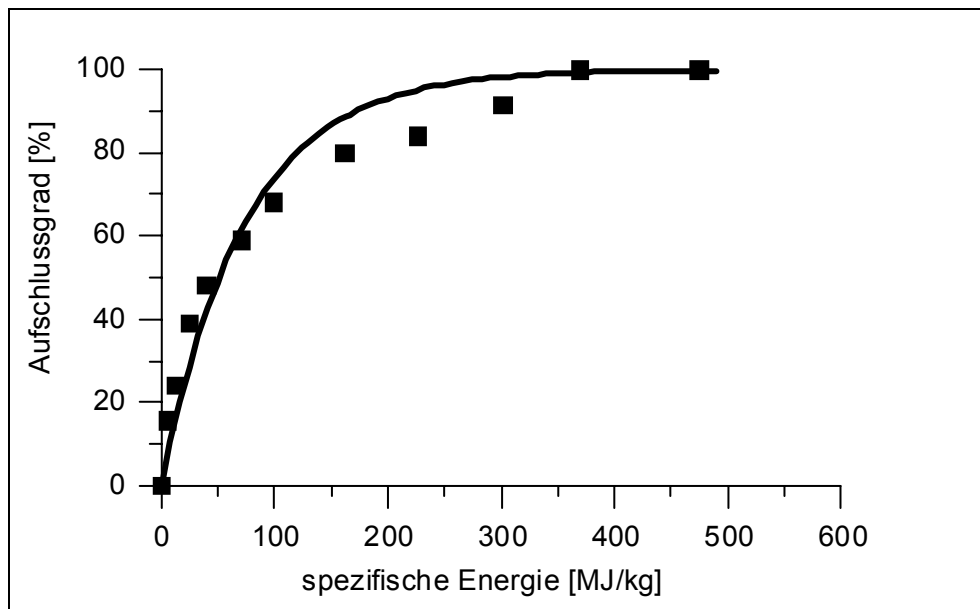


Abb. 25: Zellaufschluss von *B. megaterium* im Ultraschallhomogenisator; P = 200 W; V = 100 ml; Kurve nach Reaktion 1. Ordnung (Gleichung 14) angepasst.

In der elektronenmikroskopischen Aufnahme (Abb. 26) sind die typischen Bruchstücke von *B. megaterium* nach dem Zellaufschluss im Ultraschallhomogenisator zu sehen. Die Zellen sind lediglich an einer Stelle aufgeplatzt und die leeren Zellhüllen bleiben zurück. Es zeigt sich, dass die leeren Zellhüllen trotz des hohen Energieeintrags nur geringfügig weiter zerkleinert werden. In Kapitel 2.1.6.1, S. 10, werden die drei Theorien für den Mikroprozess beim Zellaufschluss vorgestellt: Mikrojets, Turbulenz und Druckdifferenz. Mikrojets würden Löcher in die Zellwände von *B. megaterium* schlagen. Dies ist auf den Fotos nicht zu erkennen. Gegen diese Theorie spricht auch die geringe Trägheit der Bakterien.

Ergebnisse und Diskussion

Um einen Mikrojet bei der Implosion einer Kavitationsblase zu erzeugen, darf von einer Seite her keine Flüssigkeit nachfließen. Eine feste Oberfläche vermag dies zu bewirken, jedoch würde ein Bakterium einfach von der Strömung mitgerissen werden. Würde der Aufschluss durch Turbulenz verursacht werden, so wäre zu erwarten, dass auch die leeren Zellhüllen zerkleinert würden. Dies ist aber erst bei sehr hoher Beanspruchungsdauer der Fall. Bei einem Aufschlussgrad von 100% sind die meisten Zellhüllen noch intakt. Die Tatsache, dass die Zellen in den meisten Fällen nur an einem Ende aufgeplatzt sind, weist darauf hin, dass sie durch den Dampfdruck des eingeschlossenen Cytoplasmas platzen, wenn sie in Kontakt mit einer Kavitationsblase kommen. Da Kavitationsblasen bevorzugt an Kavitationskeimen (Störungen in der Wasserstruktur z.B. durch ein Staubkorn) entstehen, ist zu erwarten, dass sie auch direkt an den Zellen gebildet werden und so der Druckunterschied zu einem Zellaufschluss führt.

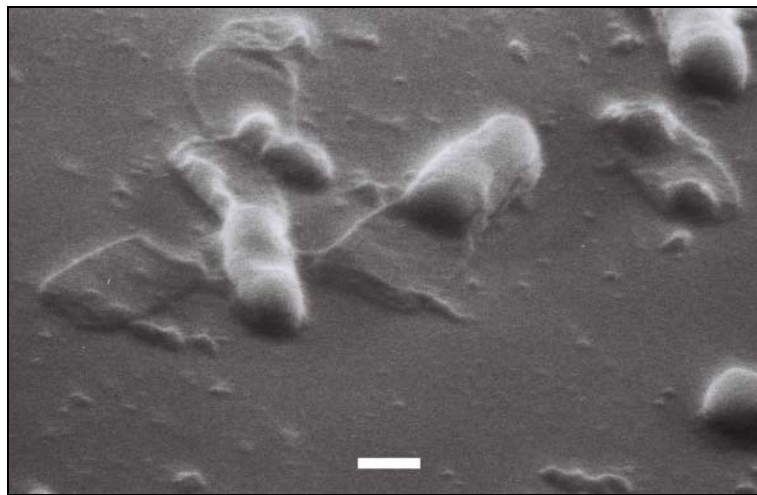


Abb. 26: *B. megaterium* nach Beanspruchung im Ultraschallhomogenisator;
 $P = 200 \text{ W}$; $E_{\text{spez}} = 161 \text{ MJ/kg}$; Maßstab: $1 \mu\text{m}$

4.1.4 Zellaufschluss von *E. coli* in der Rührwerkskugelmühle

Für diese Versuche wurde der Stamm *E. coli* TG1 verwendet. Dieser produzierte intrazellulär das rekombinante Enzym Dextransucrase, dessen Aktivität bei den verschiedenen Versuchen zum Zellaufschluss überprüft wurde.

Bei der Beanspruchung der Gram negativen Zellen zeigte sich, dass diese deutlich einfacher aufzuschließen sind und daher nicht so definierte Zelltrümmer entstehen wie bei *Bacillus megaterium*.

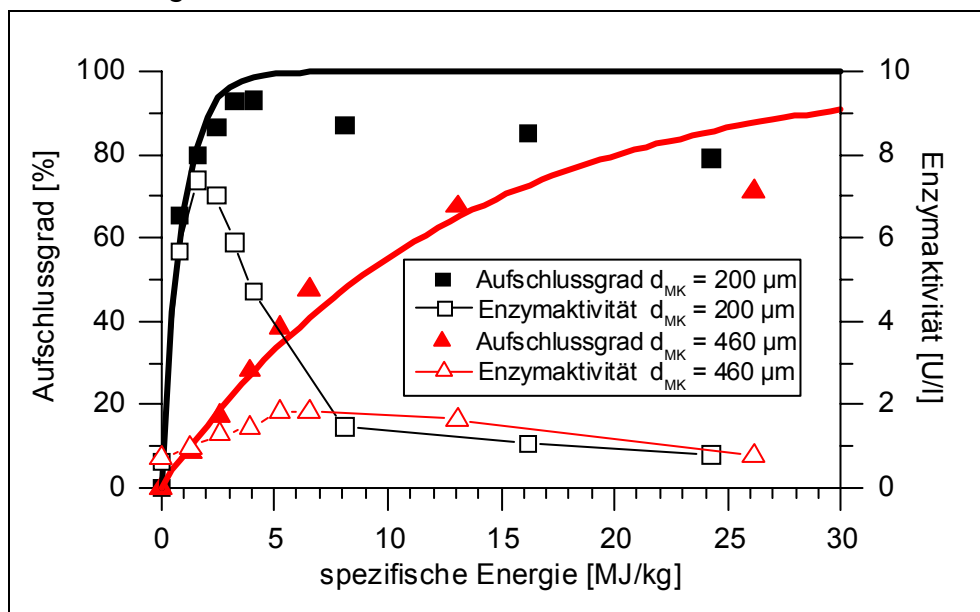


Abb. 27: Verminderung der Enzymaktivität der Dextransucrase beim Zellaufschluss von *E. coli* in der Rührwerkskugelmühle, Kurven des Aufschlussgrades nach Reaktion 1. Ordnung (Gleichung 3) angepasst; $c_{BTM} = 10 \text{ g/l}$, $v_t = 8 \text{ m/s}$

In der Rührwerkskugelmühle wurden Mahlkörper mit den Durchmessern zwischen 200 µm und 775 µm eingesetzt. Während bei *B. megaterium* ein Mahlkugeldurchmesser von 775 µm das beste Ergebnis brachte, nahm die Effizienz des Zellaufschlusses von *E. coli* mit kleineren Mahlkörpern deutlich zu. Stellvertretend sind der Aufschlussgrad und die freigesetzte Enzymaktivität für den Aufschluss mit mittleren Mahlkörpergrößen von 200 µm und 460 µm abgebildet. (Abb. 27). Da das Optimum der Mahlkörpergröße bei einem Durchmesser von 200 µm noch nicht überschritten wurde, wäre eine Verbesserung des Zellaufschlusses mit Mahlkörpern eines mittleren Durchmessers von 100 µm durchaus möglich. Die Durchführung dieses Versuchs war aber leider nicht möglich, da das Drehmoment beim Anfahren der Mühle mit so kleinen Mahlkörpern zu hoch geworden wäre und die Mühle automatisch abgeschaltet hätte. Ferner würden die Mahlkörper mit 100 µm Durchmesser das Sieb zur Mahlkörperabtrennung zusetzen und so eine repräsentative Probenahme verhindern.

Aus dem abfallenden Verlauf des Aufschlussgrades bei längerer Beanspruchungsdauer ist zu erkennen, dass diese Aufschlussmethode auf einen Teil der Proteine denaturierend wirkt. Dies wird besonders deutlich, wenn die Proteinfreisetzung mit

Ergebnisse und Diskussion

der Aktivität der Dextranucrase verglichen wird. Es ist deutlich zu sehen, dass die Enzymaktivität im Verlauf der Beanspruchung schnell abnimmt bzw. bei langsamer Freisetzung durch größere Mahlkörper keine hohen Werte erreicht. Dieser Effekt ist auf die Größe des Proteins zurückzuführen. Eine deutlich geringere Schädigung wurde in anderen Arbeiten [Bunge, 1991] beim Aufschluss von Bäckerhefe festgestellt. Die dabei freigesetzte Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase wurde während des Aufschlusses in der Rührwerkskugelmühle nur geringfügig geschädigt.

Die Zelltrümmer von *E. coli* nach einer Minute Beanspruchungszeit sind in Abb. 28 dargestellt. Es sind größtenteils leere Zellhüllen. Bei weiterer Beanspruchung werden die Zellhüllen jedoch zerkleinert. Ist es Ziel des Versuchs, möglichst große Zelltrümmer zu erzeugen, so ist beim Aufschluss mit der Rührwerkskugelmühle genau darauf zu achten, dass die Zeit für einen maximalen Aufschlussgrad nicht überschritten wird.

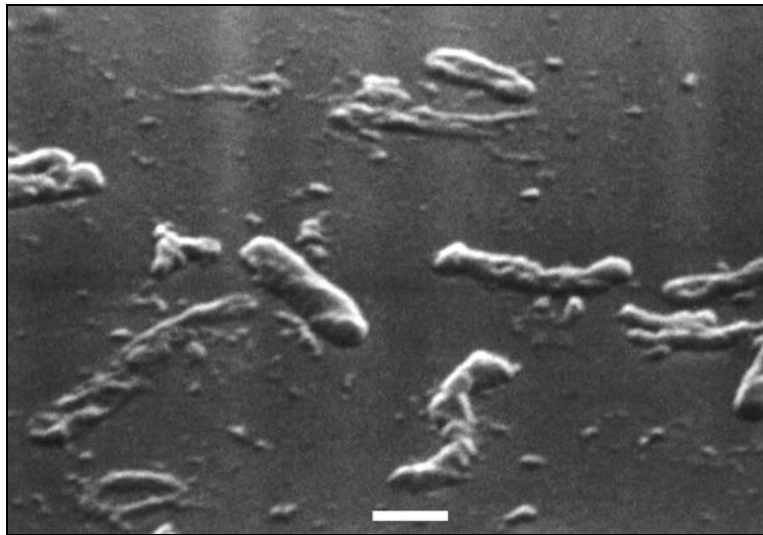


Abb. 28: Elektronenmikroskopische Aufnahme von *E. coli* während des Zellaufschlusses in der Rührwerkskugelmühle
 $d_{MK} = 200 \mu\text{m}$; $E_{\text{spez}} = 0,81 \text{ MJ/kg}$; $v_t = 8 \text{ m/s}$; Maßstab: $1 \mu\text{m}$

4.1.5 Zellaufschluss von *E. coli* im Hochdruckhomogenisator

Der rekombinante *E. coli* Stamm TG1 wurde auch mit dem Hochdruckhomogenisator aufgeschlossen. Der Druckabfall über dem Homogenisierventil wurde zwischen 200 bar und 1000 bar in Schritten von 200 bar variiert. Der Aufschlussgrad wurde wieder über die freigesetzte Proteinmenge bestimmt (Abb. 29). Die Aufschlussgrade variieren nur wenig mit der eingetragenen spezifischen Energie. Allerdings sind für einen Vollaufschluss bei niedrigen Drücken wesentlich mehr Durchläufe (jeder Punkt auf der Kurve entspricht einem Durchlauf) notwendig. Abgesehen von dem Aufschluss bei 200 bar wurden bei allen Versuchen bereits nach wenigen Durchgängen hohe Aufschlussgrade erzielt. Das beste Aufschlussergebnis konnte bei 600 bar Druckabfall gemessen werden. Allerdings wurde das Enzym Dextranucrase bei mittlerem bis hohem Druckabfall stark geschädigt. Nach Erreichen des maximalen Aufschlussgrades nahm die Enzymaktivität (wie auch bei einem Druckabfall von

Ergebnisse und Diskussion

1000 bar) stark ab. Ein Vergleich mit den freigesetzten Enzymaktivitäten in der Rührwerkskugelmühle ist nicht möglich, da die Zellen für den Hochdruckhomogenisator aus einer anderen Fermentation stammten, die bei gleicher Aufschlussmethode deutlich mehr Enzymaktivität pro Gramm Biotrockenmasse aufwies.

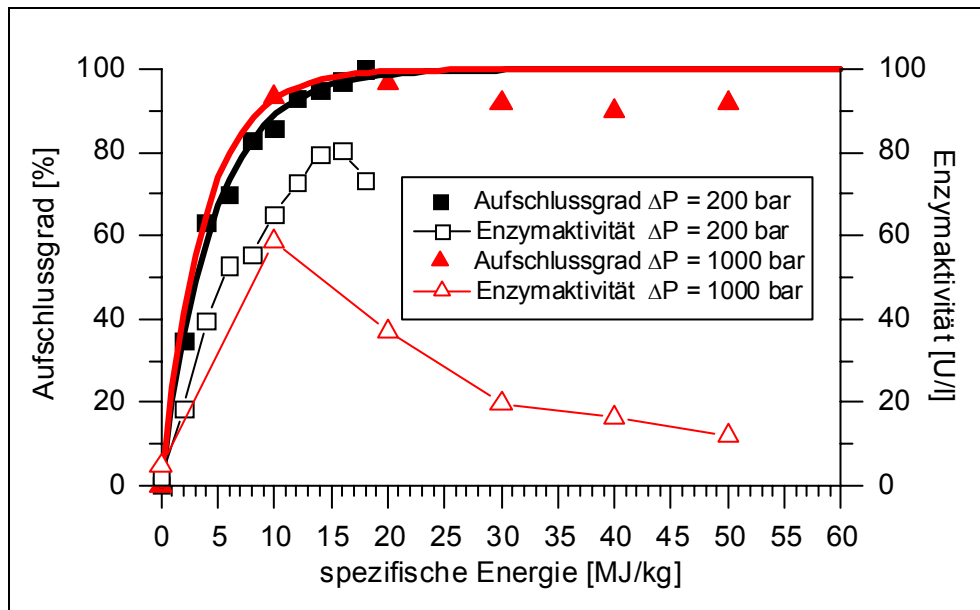


Abb. 29: Verminderung der Enzymaktivität der Dextranucrase beim Zellaufschluss von *E. coli* im Hochdruckhomogenisator, Kurven des Aufschlussgrads nach Hetherington (Gleichung 3) angepasst; $c_{BTM} = 10$ g/l

Die Zelltrümmer, die beim Zellaufschluss mit dem Hochdruckhomogenisator entstehen, sind in Abb. 30 zu sehen. Bei maximalem Aufschlussgrad wurden Zelltrümmer gebildet, die größtenteils kleiner als $0,2 \mu\text{m}$ waren.

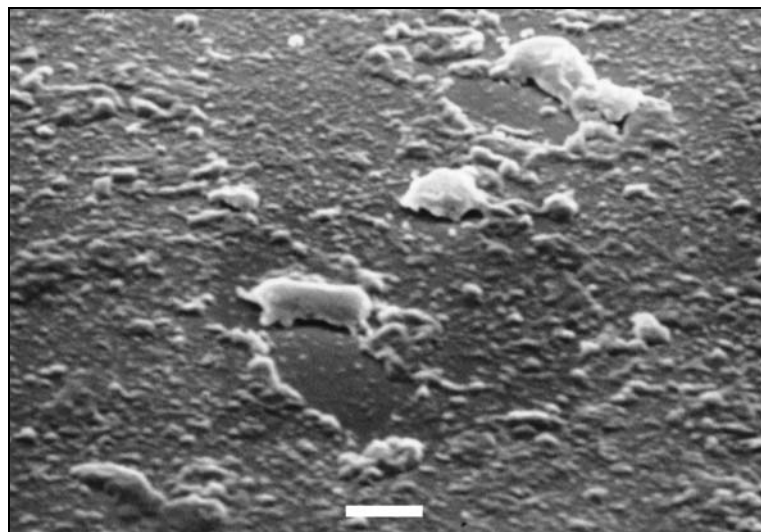


Abb. 30: Elektronenmikroskopische Aufnahme von *E. coli* nach 5 Durchgängen durch den Hochdruckhomogenisator; $\Delta p = 200$ bar; $E_{\text{spez}} = 12$ MJ/kg; $c_{BTM} = 10$ g/l; Maßstab: $1 \mu\text{m}$

Ergebnisse und Diskussion

Bei mehreren Durchläufen unter hohem Druckabfall bildete sich ein Teppich aus Zellbruchstücken, bei dem die Größe der Zelltrümmer nicht mehr zu bestimmen war. Auch Bereiche des Objektträgers, in denen die Konzentration an Biomasse geringer war, zeigten agglomerierte Bruchstücke.

4.1.6 Zellaufschluss von *E. coli* mit Hilfe des Ultraschallhomogenisators

Der Zellaufschluss mit Hilfe von Ultraschall wurde bei vier unterschiedlichen Energieeinträgen zwischen 50 Watt und 200 Watt durchgeführt. Die Ergebnisse für 50 Watt und 100 Watt sind in Abb. 31 dargestellt. Ein Vollaufschluss konnte bei Leistungseinträgen über 100 Watt erreicht werden.

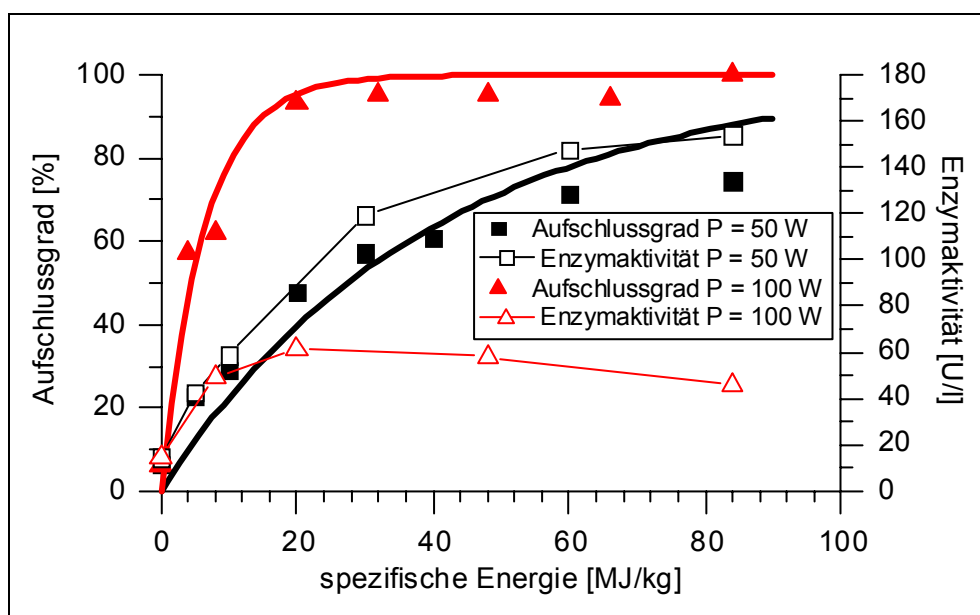


Abb. 31: Zellaufschluss von *E. coli* mit Hilfe des Ultraschallhomogenisators. Deutlich höhere Dextranucraseaktivität bei geringerem Leistungseintrag. V = 100 ml; Kurven des Aufschlussgrades nach Reaktion erster Ordnung angepasst.

Während des Aufschlusses bei 50 W wurde deutlich langsamer Protein freigesetzt. Jedoch stieg die Enzymaktivität im Gegensatz zu den Aufschlüssen mit mehr als 100 Watt Leistungseintrag stetig an. Die erreichte Endaktivität liegt dreimal höher als sie beim Aufschluss mit 100 Watt und mehr erreicht werden konnte. Aufgrund der Abkühlphasen und des geringen Leistungseintrags ist die Aufschlussdauer jedoch sehr lang. Im vorliegenden Fall wurden 100 ml Suspension 90 min beschallt.

Bei Betrachtung der Zelltrümmer fällt auf, dass zu Beginn des Versuchs noch leere Zellhüllen vorliegen, diese aber im Verlauf des Versuchs zerkleinert werden. Lediglich bei einem Leistungseintrag von 50 Watt lagen auch bei hohem Aufschlussgrad noch leere Zellhüllen vor (Abb. 32). Bei der Betrachtung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen wird klar, dass im Gegensatz zum Zellaufschluss von *B. megaterium* bei *E. coli* auch die durch die Kavitation erzeugte Turbulenz (bei einem Leistungseintrag >100 Watt) den Zellaufschluss bewirken kann.

Dieses Phänomen zeigt deutlich die strukturschwächere Zellwand des Gram negativen Bakteriums *E. coli* gegenüber der des Gram positiven Bakteriums *B. megaterium*.

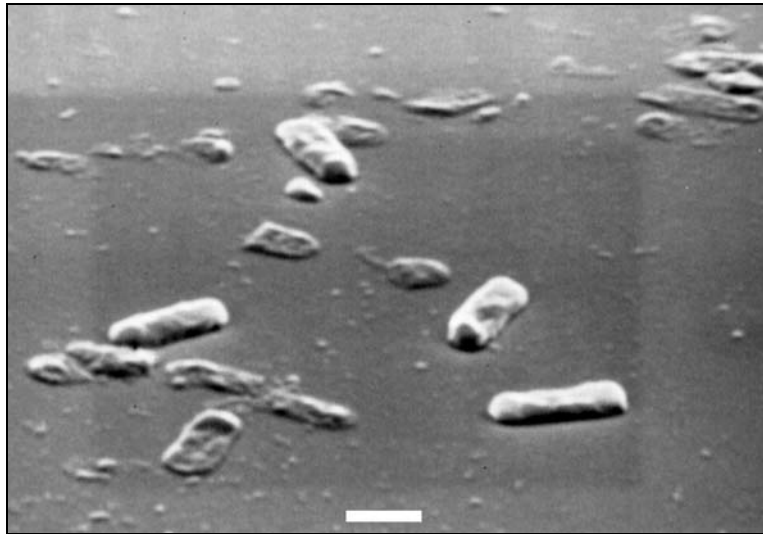


Abb. 32: Elektronenmikroskopische Aufnahme von *E. coli* während des Zellaufschlusses mittels Ultraschall; P = 50 Watt; $E_{\text{Spez}} = 60 \text{ MJ/kg}$; Maßstab: 1 μm ; (20 min Nettobeanspruchungszeit)

4.1.7 Vergleich des Zellaufschlusses von *B. megaterium* und *E. coli*

Die verschiedenen Aufschlussmethoden führten bei *B. megaterium* zu deutlichen Unterschieden in der Morphologie der Zelltrümmer. Die Rührwerkskugelmühle zerkleinerte die Zellen in Bruchstücke, die kleiner als 0,2 μm waren. Diese Bruchstücke neigten zur Agglomeration und zeigten keine ausgeprägten Formen. Im Hochdruckhomogenisator zerfielen die Zellhüllen aufgrund der hohen Scherkräfte in Ringe und Kappen, während im Ultraschallhomogenisator sehr viele Zellhüllen lediglich an einem Ende aufbrachen und ausliefen.

Die Herstellung unterschiedlicher Zelltrümmer erwies sich bei *E. coli* wesentlich schwieriger als bei *B. megaterium*. Dies ist auf die deutlich geringere Stabilität der Zellwände bei Gram negativen Bakterien zurückzuführen. Bei einem Vollaufschluss entstanden bei den meisten Versuchen undefinierte, kleine Trümmer. Lediglich aufgrund der sehr kurzen Beanspruchungszeit von *E. coli* in der Rührwerkskugelmühle (bei 200 μm durchmessenden Mahlkörpern) sowie bei einem Ultraschallaufschluss mit 50 Watt Energieeintrag konnten bei Vollaufschluss noch leere Zellhüllen beobachtet werden. Der Aufschluss mit 50 Watt Energieeintrag führte auch zu hohen, freigesetzten Enzymaktivitäten des Enzyms Dextranucrase, das von *E. coli* rekombinant produziert wurde. Das Verfahren eignet sich aber aufgrund des hohen Energieeintrags und der langen Beanspruchungsdauer in dieser Form nicht für industrielle Prozesse. Beim Aufschluss mit der Rührwerkskugelmühle wurde das Enzym stark geschädigt. Daher ist auch diese Methode nur bedingt für den Zellaufschluss geeignet.

Ergebnisse und Diskussion

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde für die Messung der Verweilzeiten im Expanded Bed das Bakterium *Bacillus megaterium* ausgewählt. Nur bei diesem konnte sichergestellt werden, dass die Zelltrümmer unterschiedliche Formen annahmen.

4.2 Einflussparameter auf die Adsorption

Zur Charakterisierung der Adsorption wurden zunächst Versuche an Einkomponentensystemen durchgeführt. Insbesondere interessierte in diesem Fall der Einfluss des Puffers auf die Adsorption und Desorption verschiedener Proteine [Herrmann, 2003]. Aufbauend auf diesen Ergebnissen wurden Adsorptionsisothermen des Proteins Rinderserumalbumin (BSA) sowie in Konkurrenz dazu der Peroxidase (POD) an Expanded Bed Adsorberpartikeln durchgeführt. Eine Messung der Adsorptionsisothermen von POD in Konkurrenz zu Zelltrümmern und Proteinüberstand erbrachte keine reproduzierbaren Ergebnisse. Daher bleibt die Frage bezüglich des Einflusses von Zelltrümmern und Proteinüberstand auf die Adsorption noch offen. Möglicherweise adsorbierte ein Teil der Peroxidase an den Zelltrümmern oder wurde durch Proteasen inaktiviert.

4.2.1 Abhängigkeit der Adsorption vom Puffersystem

Die Sorptionsisothermen von den vier Modellproteinen Lysozym (LYS), Ovalbumin (OVA), Katalase (CAT) und Rinderserumalbumin (BSA) wurden in unterschiedlichen Pufferlösungen bestimmt. Die Ergebnisse für BSA und OVA zeigt Abb. 33. Die beiden Proteine unterscheiden sich in ihrer Größe und lediglich geringfügig in ihrem isoelektrischen Punkt (Tab. 6, S. 58). Die Adsorptionsisothermen an für Lysozym und Katalase sind im Anhang (S. 107) zu finden.

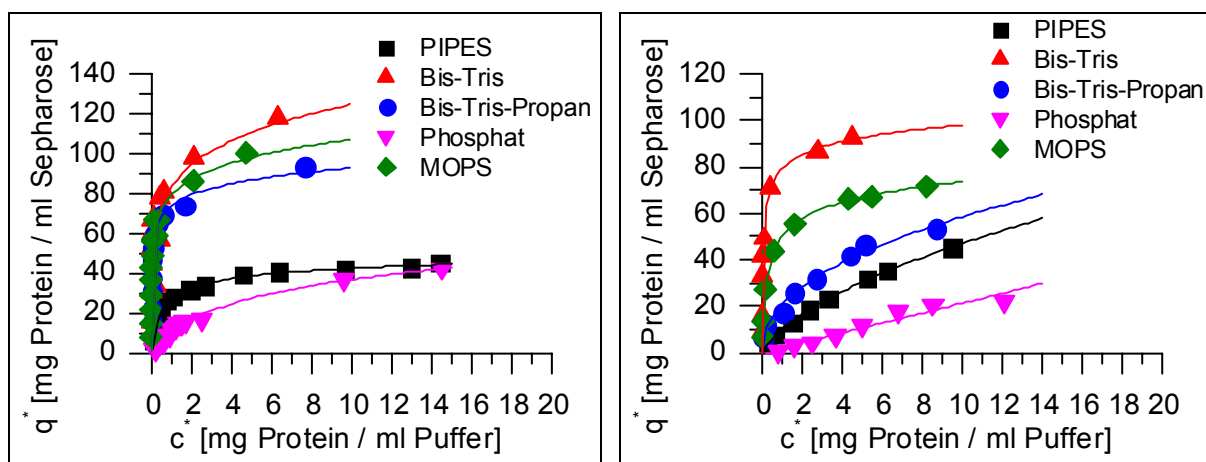


Abb. 33: Adsorptionsisothermen an DEAE-Sepharose in unterschiedlichen Puffern bei pH 7; links: BSA; rechts: OVA; Nach Redlich-Peterson (Gleichung 36) angepasst

Es zeigte sich ein unerwartet starker Einfluss der Pufferart auf den Verlauf der Adsorptionsisothermen. So kann bei der Wahl des falschen Puffers die Kapazität des Adsorbermaterials halbiert werden.

Ergebnisse und Diskussion

Die Wirkung der unterschiedlichen Puffer kann auf die tatsächlich vorliegende Anzahl Ionen und deren Wertigkeit zurückgeführt werden. Die vorliegende Konzentration dissoziierter Moleküle $[S^-]$ kann bei schwachen Säuren und Basen bei Kenntnis der pK_s -Werte mit der Henderson-Hasselbalch-Gleichung berechnet werden:

$$pH = pK_s + \frac{[S^-]}{[HS]} \quad \text{Gleichung 53}$$

Für die eingesetzten Puffer steigt diese in der Reihenfolge, wie sie in Tab. 9 aufgelistet ist.

Tab. 9: Ionenkonzentrationen der verschiedenen Puffer

Pufferart	pH	Konzentration	Ungeladen	1-wertige Ionen	2-wertige Ionen
Bis-Tris	7	20 mM	14,24 mM	5,76 mM	-
MOPS	7	20 mM	12,3 mM	7,7 mM	-
Bis-Tris-Propan	7	20 mM	7,34 mM	12,66 mM	-
PIPES	7	20 mM	0 mM	8,3 mM	11,7 mM
Phosphat	7	50 mM	0 mM	30,67 mM	19,33 mM

Mit zunehmender Ionenstärke verschlechtert sich die Kapazität des Adsorbens. Bei OVA ist dies besonders deutlich ausgeprägt. Sämtliche Adsorptionsisothermen konnten nach dem Ansatz von Redlich und Peterson (Gleichung 36) beschrieben werden. Der Ansatz nach Langmuir erwies sich als ungeeignet.

Die erhaltenen Ergebnisse aus den Adsorptionsversuchen unterscheiden sich grundsätzlich von denen aus den Desorptionsversuchen. Diese sind beispielhaft in Abb. 34 für BSA und OVA in Bis-Tris Puffer dargestellt.

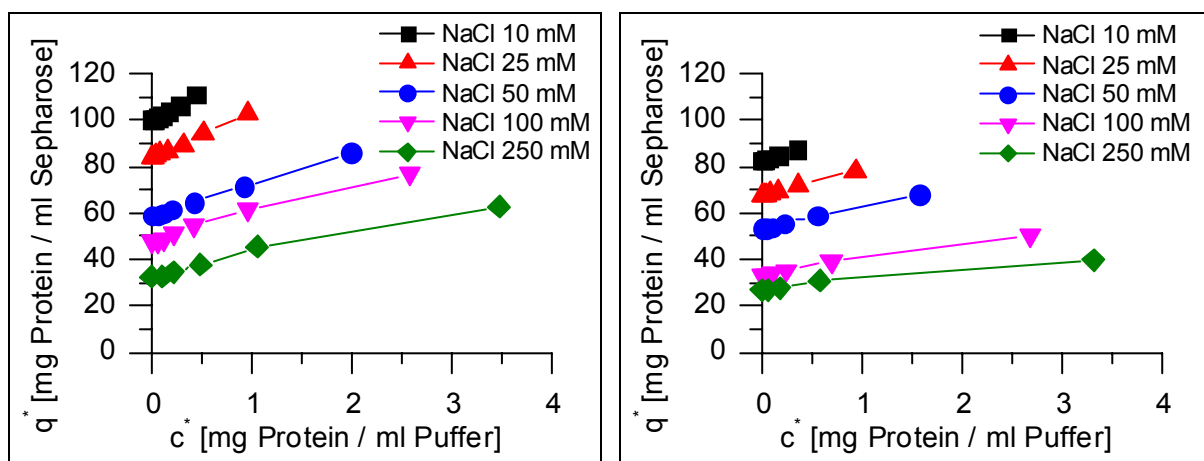


Abb. 34: Desorptionsisothermen in 20 mM Bis-Tris Puffer bei pH 7,
Adsorber: DEAE-Sepharose
links: BSA, Ausgangsbeladung: 118,5 mg/ml;
rechts: OVA, Ausgangsbeladung: 94 mg/ml

Ergebnisse und Diskussion

Bei den Desorptionsversuchen ist ein allenfalls schwacher Einfluss der Pufferart auf die Lage und den Verlauf der Desorptionsisothermen feststellbar. In Abhängigkeit von der eingesetzten Salzkonzentration sind nach 6 – 10 Gleichgewichtseinstellungen keine Proteine mehr eluierbar. Somit existiert zu jeder eingesetzten NaCl-Konzentration eine auf der stationären Phase verbleibende Beladung. Alle erhaltenen Desorptionsisothermen gleichen sich in ihrem Verlauf, unterscheiden sich aber in ihrem Ordinatenabschnitt (Minimalbeladung). Die wesentlichen Einflussfaktoren auf die Lage der Isothermen stellen die zuvor bei der Adsorption eingestellte Beladung der stationären Phase sowie die im Desorptionspuffer vorliegende Ionenkonzentration dar. In Tab. 10 sind die relativen desorbierbaren Proteinmengen bei verschiedenen Salzkonzentrationen dargestellt. Es zeigt sich, dass die Werte für BSA und OVA nahezu identisch sind. Die Wiederfindungsrate des relativ großen Enzyms Katalase liegt deutlich niedriger.

Tab. 10: Von der Ausgangsbeladung desorbierbare Proteinmenge (in %) bei verschiedenen Salzkonzentrationen

Protein	NaCl-Konzentration [mM]				
	10	20	30	40	50
BSA	20	32	50	74	85
OVA	14	30	54	78	82
CAT	11	25	44	65	75

Die vermessenen Desorptionsdaten lassen sich am einfachsten durch lineare Ansätze erfassen.

4.2.2 Adsorption an Expanded Bed Adsorberpartikeln

Die Versuche zur Adsorption an Expanded Bed Adsorberpartikeln wurden mit den Proteinen Peroxidase (siehe auch S. 59) und Rinderserumalbumin (siehe auch S. 59) durchgeführt. Von beiden Enzymen wurden zunächst Adsorptionsisothermen aufgenommen (siehe Abb. 35 rechts und Abb. 36). Im Anschluss folgte die konkurrierende Adsorption beider Enzyme (Abb. 36), wobei die BSA Ausgangskonzentration konstant bei 0,13 g/l belassen wurde, während die POD Konzentration zwischen 0 g/l und 0,21 g/l variiert wurde. Aufgrund der Größe der Expanded Bed Adsorberpartikel musste die Reaktionszeit, die bis zur Einstellung des Gleichgewichts notwendig war, von 30 min auf 60 min angehoben werden. Die in Abb. 35 links dargestellte Adsorptionskinetik zeigt deutlich eine Änderung der Adsorptionsgeschwindigkeit von BSA nach 30 bis 40 min.

Ergebnisse und Diskussion

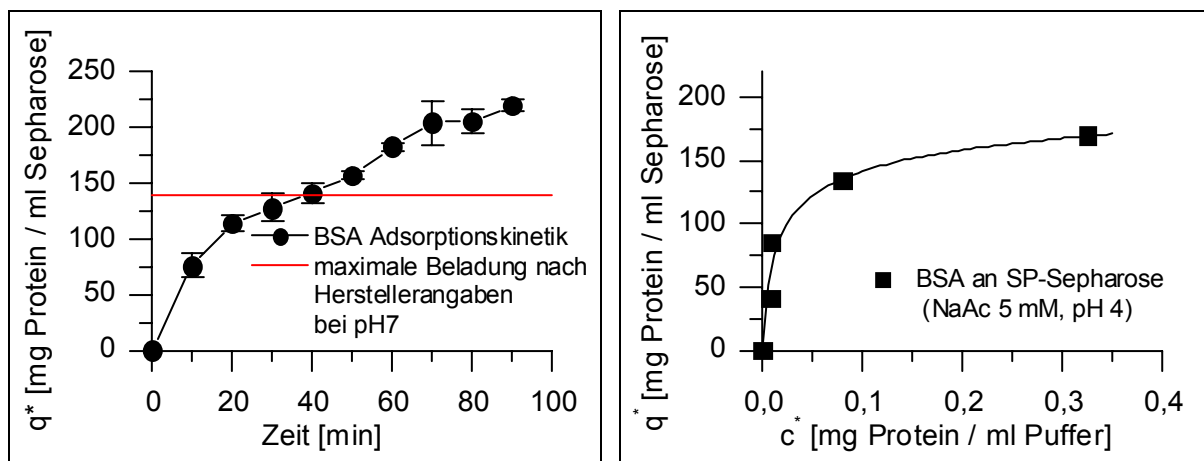


Abb. 35: Adsorption von BSA an SP-Sepharose; Puffer: NaAc 5 mM, pH 4; links: Kinetik der Adsorption, $c_0 = 0,48$ g/l; rechts: Adsorptionsisotherme, Zeit zur Gleichgewichtseinstellung: 60 min, $c_0 = 0,076$ g/l bis 0,606 g/l

Dies deutet auf eine Änderung des Adsorptionsmechanismus hin, wie es z.B. bei der Ausbildung von Multilayern der Fall ist. Laut Herstellerangaben beträgt die maximale Kapazität des Adsorbers für BSA 140 mg/ml bei pH 7. Das Maximum von 220 mg/ml, das im Laufe der Messung der Reaktionskinetik erreicht wurde, belegt, dass bei einem pH-Wert von 4 BSA zur Bildung von Multilayern neigt. Da das Gleichgewicht auch nach 120 Minuten noch nicht eingestellt war (Versuch nicht dargestellt), wurde aus praktischen Gründen für die Versuchsdauer eine Zeit von 60 min festgesetzt.

Im Gegensatz zum 67 kD großen Protein BSA erreichte das 44 kD große Enzym POD das Gleichgewicht bereits nach 25 min. Die maximale Beladung der SP-Sepharose mit POD (Abb. 36) beträgt lediglich 85 mg/ml. Die Isotherme wurde nach Redlich-Peterson (Gleichung 36, S. 39) und nach Langmuir (Gleichung 33, S. 39) angepasst, da die Redlich-Peterson Isotherme eine negative Steigung zeigt, dies aber physikalisch nicht sinnvoll ist. In Anwesenheit von BSA verläuft die Isotherme wesentlich flacher. Ferner ist gut zu erkennen, dass die POD mit dem BSA um die Adsorberplätze konkurriert (kompetitive Adsorption), da mit zunehmender POD-Konzentration weniger BSA adsorbiert wird.

Ergebnisse und Diskussion

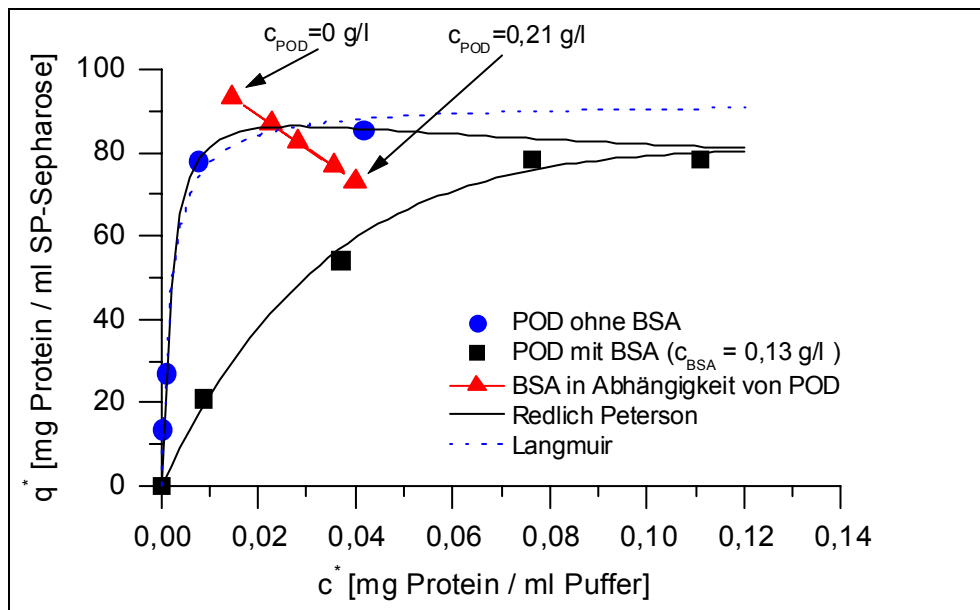


Abb. 36: Kompetitive Adsorption von BSA und POD in An- und Abwesenheit einer festen BSA-Konzentration, in 5 mM NaAc-Puffer, pH 4

Erstaunlich ist, dass bei nahezu maximaler POD-Adsorption (80 mg/ml) die Beladung mit BSA nur um 20 mg/ml abnimmt. Beim Vergleich der Kapazität des Adsorbers in An- bzw. Abwesenheit von BSA fällt auf, dass diese durch die Anwesenheit von BSA um nur 10 mg/ml abnimmt.

4.2.3 Zusammenfassung des Kapitels Adsorption

Die Messungen der Adsorptionskinetiken und -isothermen konnten einen kleinen Einblick geben, wie stark der Adsorptionsvorgang von der Pufferart und konkurrierenden Enzymen abhängig ist.

Die Kapazität des Adsorbermaterials nahm mit steigender Ionenkonzentration stark ab. Da ein Teil des Puffers dissoziiert vorliegt (abhängig vom pH-Wert und pK_s -Wert), kann die Kapazität abhängig von der Pufferart trotz gleicher Ausgangskonzentration um den Faktor zwei schwanken. Ein weiterer großer Einflussfaktor ist das Enzym selbst. Neben der sterischen Hinderung, die einen Teil der Adsorberplätze für große Enzyme unerreichbar macht, spielen auch Wechselwirkungen der Proteine untereinander sowie deren Ladungsverteilung auf der Oberfläche eine Rolle. Die allgemeine Aussage, dass große Proteine zu einer geringeren Kapazität führen würden (da sie einen Teil der Adsorberplätze nicht erreichen), kann nicht bestätigt werden. Für die Enzyme POD und OVA wird bereits bei deutlich geringeren Beladungen die maximale Kapazität des Adsorbermaterials erreicht, als es für das größere BSA der Fall ist. Die Messungen erwiesen sich in der Praxis als sehr schwierig. Selbst kleinste Änderungen in der Durchführung führten zu anderen Ergebnissen. Das Ziel, die Kapazitätsabnahme der Adsorberpartikel aufgrund der Anwesenheit von Zelltrümmern zu messen, konnte nicht erreicht werden, jedoch konnte anhand der konkurrierenden Adsorption die Verminderung der Kapazität durch konkurrierende Proteine gezeigt werden.

4.3 Fluidodynamik im Expanded Bed

Im folgenden Kapitel wird auf die strömungsmechanischen Eigenschaften des Expanded Beds eingegangen. Zunächst wird das Expansionsverhalten der Adsorberpartikel untersucht und anschließend auf die Partikelgrößenverteilung entlang der Säule eingegangen. Abschließend erfolgt die Darstellung der Verweilzeitverteilung in der unbeladenen Säule.

4.3.1 Expansionsverhalten

Die Messung der Bettausdehnung bei verschiedenen Durchflüssen (z.B. Streamline DEAE Abb. 37) zeigte, dass die Expansion nach wenigen Minuten ein Maximum überschreitet, um danach einen etwas niedrigeren konstanten Wert anzunehmen.

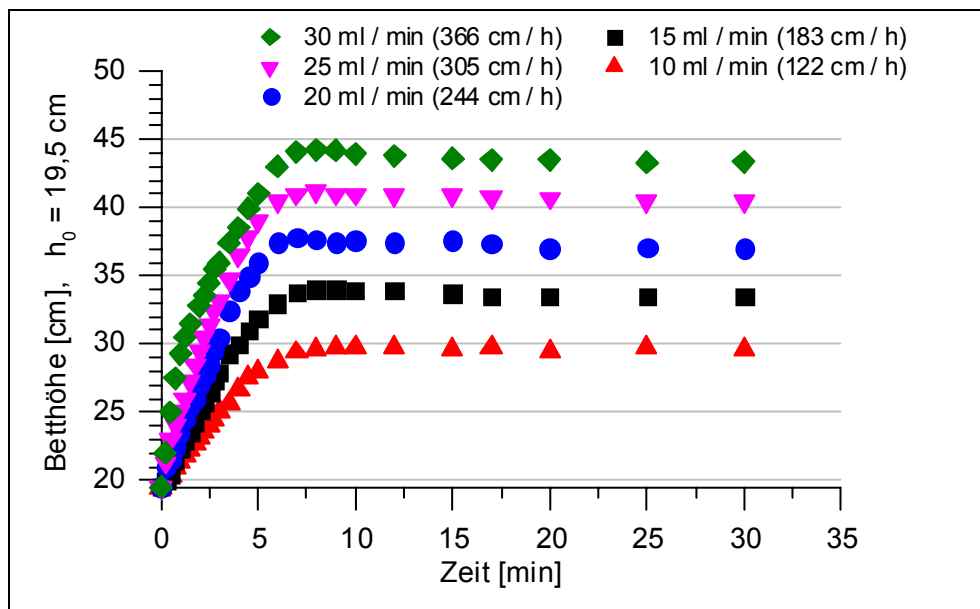


Abb. 37: Expansionskinetik von Streamline DEAE bei unterschiedlichen Durchflüssen, Säule: 2,5 cm Durchmesser, Puffer: 50 mM Tris/HCl pH 7,5

Während der Klassierung der Adsorberpartikel nimmt die Betthöhe langsam ab. Es zeigte sich, dass selbst nach 30 Minuten noch kleine Änderungen in der Betthöhe zu messen waren. Dies war insbesondere bei hohen Leerrohrgeschwindigkeiten der Fall (Abb. 37 zeigt Leerrohrgeschwindigkeiten von 122 cm/h bis 366 cm/h). Die maximale Bettausdehnung ist in Form des Hohlraumanteils in Abb. 38 der Leerrohrgeschwindigkeit gegenübergestellt.

Ergebnisse und Diskussion

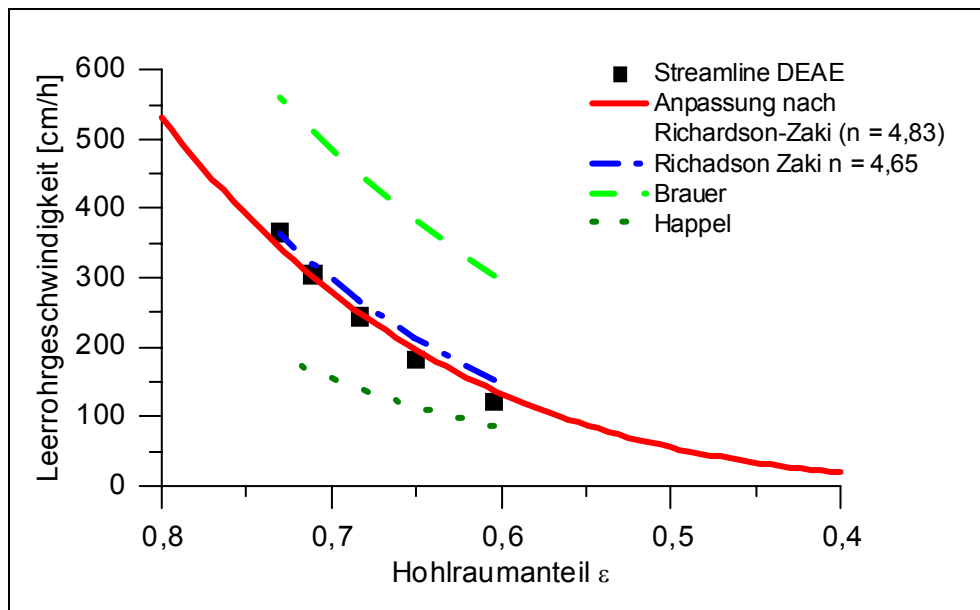


Abb. 38: Abhängigkeit der Schwarmsinkgeschwindigkeit vom Hohlraumanteil. Beste Anpassung der Kurve mit der Gleichung nach Richardson und Zaki (Gleichung 21).

Die Messpunkte wurden mit den Theorien von Richardson und Zaki (Gleichung 21, S. 30), Brauer (Gleichung 22, S. 31) und Happel (Gleichung 23, S. 31) verglichen. Es zeigte sich, dass die Gleichung nach Richardson und Zaki den Messwerten am Besten entsprach. Der ermittelte Exponent n nahm aber nicht den Literaturwert 4,65 an, sondern 4,83. Diese Abweichung lässt sich durch die unterschiedlichen Partikel erklären, die bei den Experimenten eingesetzt wurden. Die Partikel, die Richardson und Zaki [Richardson und Zaki, 1997] (Reprint von 1954) einsetzten, waren nicht porös und wiesen vermutlich eine schmalere Partikelgrößenverteilung auf. Ferner waren die meisten getesteten Partikel größer und besaßen eine höhere Dichte als die Adsorberpartikel. Die berechneten Werte nach Brauer liegen insgesamt zu hoch, geben aber die Steigung der Datenpunkte gut wieder. Die berechneten Werte für die Leerrohrgeschwindigkeit nach Happel sind zu niedrig und der Kurvenverlauf ist zu flach.

4.3.2 Partikelgrößenverteilung entlang der Säule

Die Partikelgrößenverteilungen in unterschiedlichen Höhen der Expanded Bed Säule wurde an der Eigenkonstruktion mit 5 cm Durchmesser gemessen. [Reershemius, 2004]. Dazu wurden Proben in unterschiedlichen Abständen zum Boden gezogen und mittels Laserspektroskopie (Kapitel 3.2.6, S. 57) analysiert. Wie in Abb. 39 dargestellt, nahm der Medianwert der Partikelgrößenverteilung mit der Probenahmehöhe ab.

Ergebnisse und Diskussion

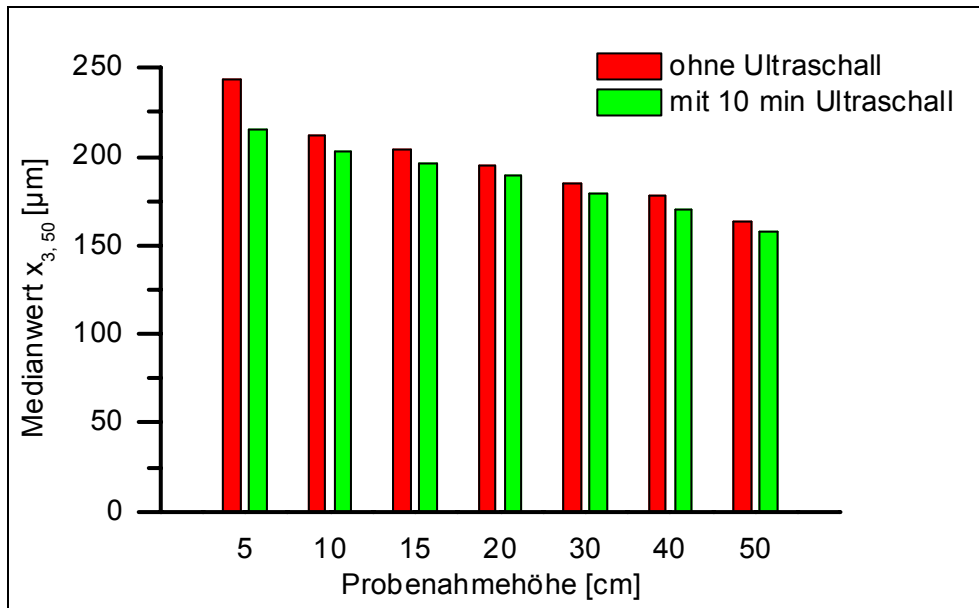


Abb. 39: Medianwert der Partikelgrößenverteilung entlang der Säule; $d_c = 5$ cm; $u_0 = 260$ cm/h (85 ml/min), Streamline SP, Puffer: Imidazol pH 7

Eine Behandlung mit Ultraschall machte sich besonders im untersten Teil der Säule bemerkbar. Dies war auch so zu erwarten, da Partikelagglomerate aufgrund ihrer Größe und der daraus resultierenden erhöhten Sinkgeschwindigkeit nach unten sinken.

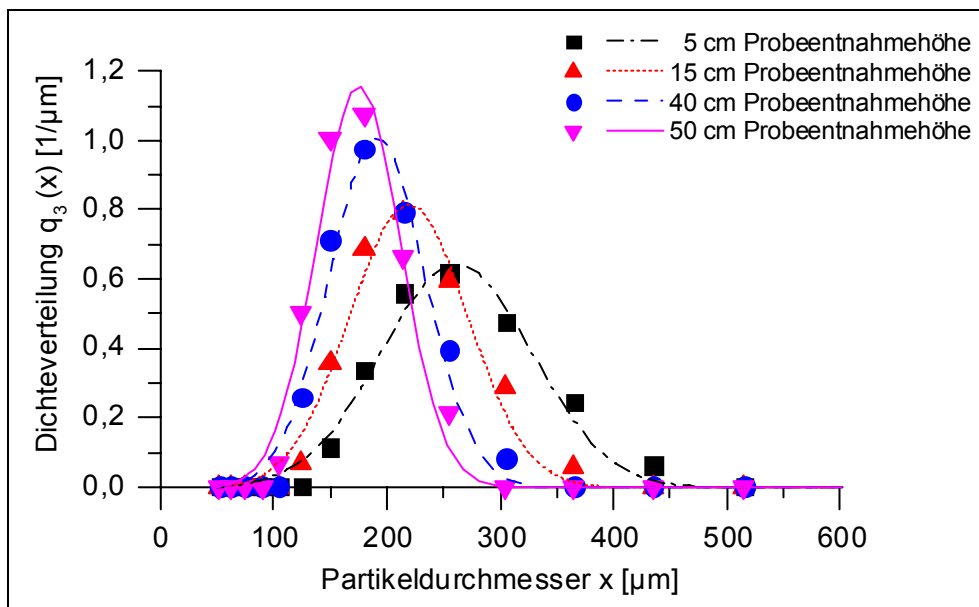


Abb. 40: Darstellung der Partikelgrößenverteilungsdichte $q_3(x)$ über der Partikelgröße nach 10 Minuten Ultraschallbehandlung in unterschiedlicher Säulenhöhe; $d_c = 5$ cm; $u_0 = 260$ cm/h (85 ml/min), Messwerte mit Gaußscher Normalverteilung angepasst

Die Darstellung der Partikelgrößenverteilung in Abhängigkeit von der Probenahmehöhe (Abb. 40) zeigt, dass keine perfekte Klassierung der Partikel in der Säule vor-

Ergebnisse und Diskussion

lag. Während im unteren Teil der Säule alle Partikelgrößen vertreten waren, waren im oberen Teil nur sehr wenige große Partikel zu finden. Diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen aus der Literatur [Willoughby et al., 2000; Bruce und Chase, 2001; Tong und Sun, 2002b].

4.3.3 Verweilzeit ohne Zelltrümmer

Die Messung der Verweilzeit ohne Zelltrümmer wurde bei jedem Versuch zur Kontrolle der nachfolgenden Messung mit Zelltrümmern durchgeführt. Es zeigte sich, dass die Bodensteinzahl sehr stark davon abhängig ist, ob die Säule exakt senkrecht steht und ob das Sieb, das den Adsorber in der Säule einschließt, keine verstopften Stellen aufweist. Auch die verschiedenen Adsorbermaterialien verhielten sich unterschiedlich. Streamline QXL neigte bei neutralem pH-Wert zur Agglomeration, so dass sich große Flocken von mehreren Millimetern Durchmesser bildeten. Da der Hohlraumanteil in den Flocken nun auch nicht mehr durchströmt wurde, sondern lediglich durch Diffusion erreichbar war, verringerte sich das effektive Säulenvolumen, und das Maximum der $E(\theta)$ -Kurve wurde zu kleineren Werten hin verschoben. Dieser Vorgang wurde durch die Bildung von Strömungskanälen noch unterstützt. Ferner zeigten die Kurven ein ausgesprochen starkes Tailing (Abb. 41). Dies ist auf diffusive Interaktion des Markers mit den Agglomeratflocken zurückzuführen. Beide Phänomene führen zu einer Verringerung der Bodensteinzahl. Aufgrund der Veränderung des effektiven Säulenvolumens durch Flockenbildung ist die exakte Berechnung der reduzierten Verweilzeit nicht möglich. Dies führt, zusammen mit der überlagerten diffusiven Interaktion des Signalstoffs mit den Adsorberpartikeln und Flocken dazu, dass die Flächen unter den Kurven der Verweilzeitdichtefunktionen bei einer reduzierten Verweilzeit von eins nicht in zwei gleich große Flächen geteilt werden.

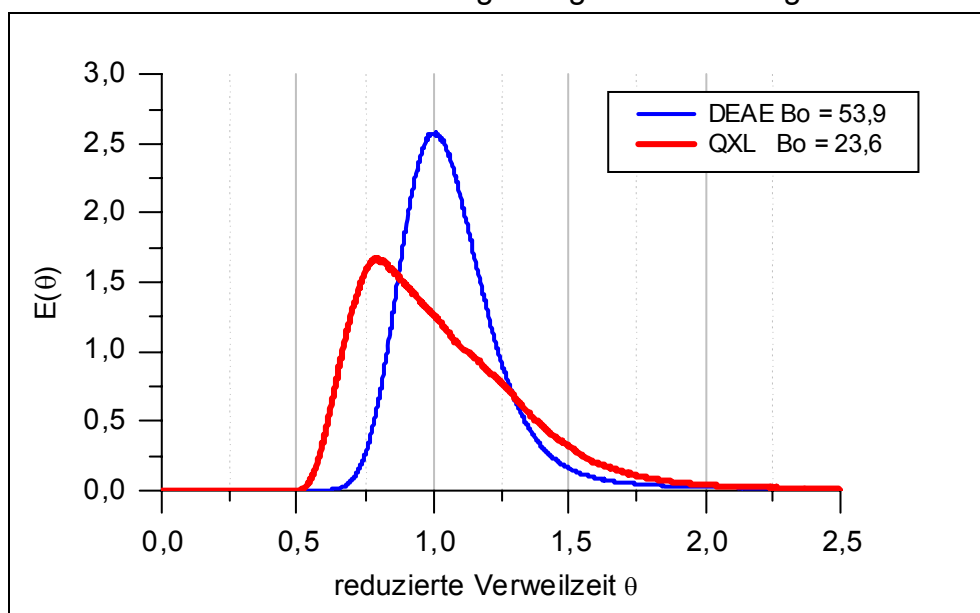


Abb. 41: Vergleich der verschiedenen Adsorber, DEAE in 50 mM Tris/HCl pH 7,5; QXL in 20 mM Phosphatpuffer pH 7,5

Die dargestellte Kurve der Verweilzeitverteilung von QXL zeigt den Adsorber unter besonders ungünstigen Bedingungen. Durch die Erhöhung der Salzkonzentration sowie bei extremen pH Werten (kleiner pH 4 oder größer pH 10) konnte die Agglomerationsneigung unterbunden werden. Für die Aufreinigung von Proteinen werden in der Regel aber geringe Salzkonzentrationen und milde pH-Werte benötigt.

Die unterschiedliche Agglomerationsneigung ist wie folgt zu erklären: Um die Interaktionen des Anionenaustauschers mit den negativ geladenen Zelltrümmern zu vermindern, wurden die Adsorberpartikel vom Hersteller mit einer Dextranhülle versehen. Aufgrund dieser ungeladenen äußeren Schicht fehlen aber auch die stabilisierenden elektrostatischen Abstoßungskräfte der Adsorberpartikel untereinander. Kommen sich zwei Partikel zu nahe, so überwiegen die attraktiven van-der-Waals Wechselwirkungen und die Partikel agglomerieren. Extreme pH Bedingungen führen zu einer Ladung der Dextranschicht. Die Hydroxidgruppen der Glucosemoleküle können bei hohen pH-Werten ihr Proton abspalten. Ebenso kann der Sauerstoff bei niedrigen pH-Werten mit seinen freien Elektronenpaaren als Base fungieren und ein Proton binden. In Lösung befindliche Ionen schirmen die attraktiven als auch die abstoßenden Kräfte ab. Daher rührt auch bei hohen Salzkonzentrationen eine verringerte Agglomerationsneigung.

Aufgrund der Schwierigkeiten mit dem Adsorber QXL wurde im Folgenden mit DEAE gearbeitet. Dabei handelt es sich ebenfalls um einen Anionenaustauscher, der jedoch nicht mit Dextran beschichtet ist. Ferner ist die Ladung unter verschiedenen pH-Werten weniger stabil (schwacher Anionenaustauscher).

4.4 Einfluss von Zelltrümmern auf die Verweilzeitverteilung im Expanded Bed

Auf Seite 34 in Kapitel 2.2.3.1 wurde bereits auf die Interaktionen der Zelltrümmer mit dem Adsorbermaterial eingegangen. Zur Untersuchung des Einflusses dieser Interaktionen auf die Verweilzeitverteilung [Nolte, 2005] wurden die Zelltrümmer von *Bacillus megaterium* eingesetzt, da diese in den verschiedenen Zellaufschlussgeräten unterschiedliche Zelltrümmerformen annahmen. Für die Messungen wurde eine Bio-trockenmassekonzentration von 20 g/l in 50 mM Tris/HCl Puffer pH 7,5 eingestellt. Folgende Einstellungen wurden für den Zellaufschluss gewählt:

- Zur Beanspruchung der Zellen im **Hochdruckhomogenisator** wurde die Suspension bei 400 bar Druckabfall fünf mal durch das Ventil gepumpt.
- Die Beanspruchungszeit in der **Rührwerkskugelmühle** betrug 30 Minuten bei Mahlkörpern mit 775 µm Durchmesser und 8 m/s Umfangsgeschwindigkeit.
- Bei der Durchführung des **Ultraschallaufschlusses** wurden 3 Liter Suspension drei bis sechs Minuten mit dem UIP100 bei 100% Leistungseintrag beschallt.

Ergebnisse und Diskussion

Bei allen Zellaufschlüssen erreichte die Konzentration des freigesetzten Proteins einen konstanten Wert. Dieser Wert lag beim Ultraschallaufschluss aber deutlich niedriger als bei den anderen Aufschlussmethoden. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigten, dass nur etwa die Hälfte der Zellen aufgeschlossen wurden. Auch die Verdopplung der Beschallungsdauer führte zu keiner Verbesserung des Aufschlussgrades. Die Zelltrümmer hatten allerdings bei allen Aufschlussmethoden ihre typische Form.

Die Messungen wurden zunächst als Doppelbestimmung durchgeführt. Bei den Zelltrümmern aus dem Ultraschallhomogenisator und der Rührwerkskugelmühle wichen die Messwerte voneinander ab, so dass zusätzliche Versuche durchgeführt wurden.

Tab. 11: Anzahl der pro Versuchsteil durchgeführten Experimente

	Ganze Zellen	Hochdruck-homogenisator	Ultraschall-homogenisator	Rührwerks-kugelmühle
Anzahl Versuche:	2	2	3	5

Vor jeder Messung mit Zelltrümmern wurde eine Messung ohne Zelltrümmer durchgeführt, deren Bodensteinzahl über 40 (unkorrigiert) liegen musste. Die dabei ermittelten Bodensteinzahlen schwankten zwischen 47,5 und 60. Der Mittelwert aller Vorversuche betrug 54,2. Ausgehend von diesen Vorversuchen wurde die Abnahme der Bodensteinzahl in Anwesenheit von Zelltrümmern bestimmt. Abb. 42 zeigt den Einfluss ganzer Zellen sowie der Zelltrümmer von *B. megaterium* aus verschiedenen Aufschlussgeräten auf das Verweilzeitverhalten im Expanded Bed.

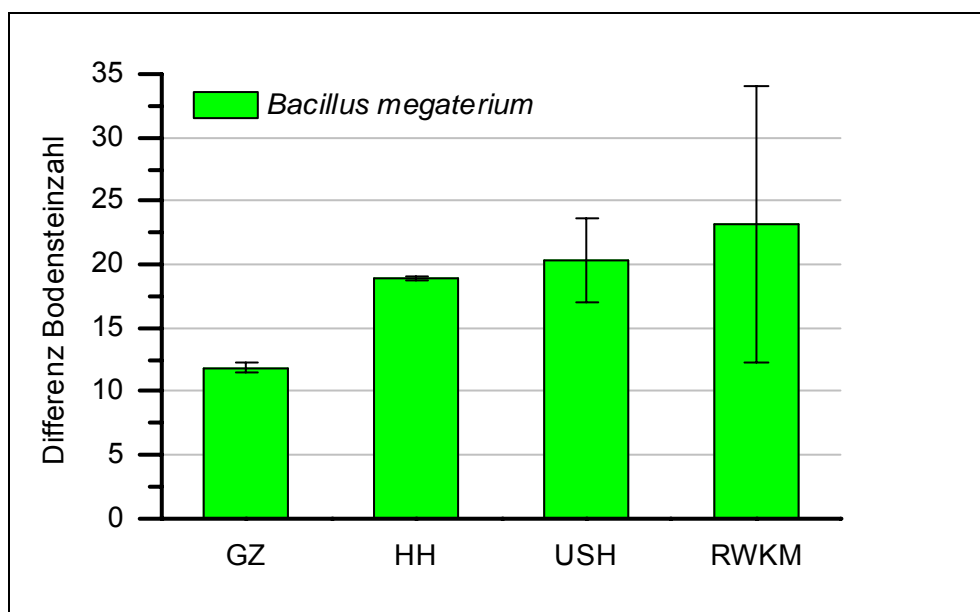


Abb. 42: Differenz der Bodensteinzahlen bei der Verweilzeitmessung; GZ: Ganze Zellen, HH: Hochdruckhomogenisator, USH: Ultraschallhomogenisator, RWKM: Rührwerkskugelmühle; Fehlerbalken: Vertrauensbereich (95%)

Im Diagramm sind die Mittelwerte der Differenzen zwischen den Messungen sowie deren Konfidenzintervalle (95%) dargestellt. Die dazugehörigen Einzelmessungen sind im Anhang in Abb. 50, S. 108, dargestellt. Da bei den Messungen mit Zelltrümmern die Grundlinie aufgrund der Fluoreszenz der Zelltrümmer z. T. noch anstieg, wurden die Bodensteinzahlen aller Messungen korrigiert, indem eine schiefe Grundlinie angelegt wurde (siehe auch Kapitel 3.4.3, S. 64). Es zeigte sich, dass der Einfluss der Aufschlussmethode auf die Verweilzeit durch die Korrektur der Grundlinie deutlich klarer wurde.

Die geringste Störung der Verweilzeit verursachen ganze Zellen. Von den Zelltrümmern verursachen die aus dem Hochdruckhomogenisator die kleinste Bodensteinzahldifferenz. Die Zelltrümmer aus der Rührwerkskugelmühle führten im Mittel zur größten Rückvermischung. Wie am Konfidenzintervall in Abb. 42 zu sehen ist, unterlagen sie auch den größten Schwankungen.

Der Grund für die unterschiedlichen Ergebnisse bei den verschiedenen Zellaufschlussmethoden kann bei folgenden Ursachen liegen:

- Unterschiede in der Viskosität der Suspensionen
Die Reduktion der Bodensteinzahl könnte auf die Ausdehnung des fluidisierten Betts aufgrund der erhöhten Viskosität (im Vergleich zum Puffer) zurückzuführen sein.
- Unterschiede in der Agglomeration von Adsorberpartikeln
Agglomerieren Adsorberpartikel aufgrund von Wechselwirkungen mit den Zelltrümmern, so ändern sie ihre Größe und somit ihre Position im Expanded Bed. Dies führt zu einer verstärkten Rückvermischung.

Die möglichen Ursachen wurden untersucht und werden im Folgenden diskutiert.

4.4.1 Die Viskositätsänderung als Grund für die veränderte Verweilzeitverteilung

Die Änderung der Viskosität nach einem Zellaufschluss von *Bacillus megaterium* ist bei einem Biotrockenmassegehalt von 20 g/l nur gering. Die Messungen der Viskosität vor und nach dem Aufschluss ergaben keine signifikante Änderung. Die Werte lagen für alle Zellaufschlussmethoden bei 4 mPas ($\pm 0,1$ mPas).

Dies liegt vermutlich daran, dass der Gehalt an DNA im Vergleich zu Hefezellen (bei denen eine deutliche Erhöhung der Viskosität messbar ist) wesentlich geringer ist. Trotzdem könnte die Ausdehnung des Expanded Beds in dem Moment, wenn von dem niedrigviskosen Puffer auf die deutlich höher viskose Zellsuspension umgeschaltet wird, zu einer Verbreiterung der Verweilzeitverteilung führen. Um den Einfluss der Viskosität auf die Verweilzeitverteilung abschätzen zu können, wurden Messungen mit einem 20% Glycerin/Wasser Gemisch (V/V, $\eta = 4,5$ mPas) durchgeführt. Der Mittelwert der Bodensteinzahldifferenz lag bei 4,8, und damit deutlich unter dem Wert ganzer Zellen ($\Delta Bo = 11,8$). Somit scheidet die Viskosität als maßgeblicher Grund für die Verbreiterung der Verweilzeitverteilung aus. Dies deckt sich auch

Ergebnisse und Diskussion

mit den Ergebnissen aus der Literatur [Lin et al., 2003b]. In den dort vorgenommenen Versuchen wurde ebenfalls nur ein geringer Unterschied zwischen den Verweilzeitverteilungen mit und ohne Glycerin gemessen.

4.4.2 Veränderung der Verweilzeitverteilung durch Agglomeration

Mit Hilfe elektronenmikroskopischer Aufnahmen kann gezeigt werden, dass die Zelltrümmer zu einer Agglomeration der Adsorberpartikel führen (Abb. 43).

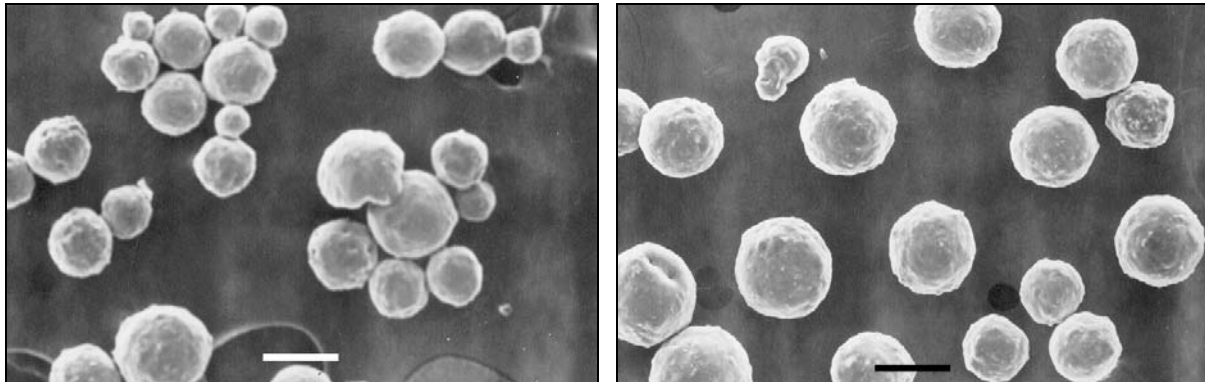


Abb. 43: Adsorberpartikel SP XL links: mit Zelltrümmern, rechts: nach der CIP - Prozedur, Maßstab: 100 µm

Die durch die Agglomeration veränderten Sinkgeschwindigkeiten führen zu einer Neuordnung der Adsorberpartikel im Expanded Bed und damit zur Verringerung der Bodensteinzahl. Die Zelltrümmer dienen dabei als Brücke zwischen den einzelnen Adsorberpartikeln. Die Haftkräfte zwischen den Zelltrümmern und Ionenaustauschern sind also maßgeblich für die Verringerung der Bodensteinzahl. Gründe für die unterschiedlichen Wechselwirkungen bei den Zelltrümmern aus verschiedenen Apparaten könnten auf Unterschieden in den elektrostatischen Wechselwirkungen (messbar durch das Zeta-Potential) oder auf unterschiedlichen Interaktionsmöglichkeiten aufgrund der Zelltrümmergeometrie basieren. Der Effekt einer Reinigung des Adsorbermaterials mittels CIP-Prozedur (Kapitel 3.4.3.3, S. 68), ist in Abb. 43 auf der rechten Seite zu erkennen.

4.4.2.1 Veränderung des Zeta-Potentials durch den Zellaufschluss

Der Betrag des Zeta-Potentials wird, wie in Abb. 44 dargestellt, durch den Zellaufschluss leicht gesenkt. Dies stimmt qualitativ mit den Ergebnissen aus der Literatur [Brixius, 2003; Lin et al., 2003a] überein. Die absoluten Werte unterscheiden sich jedoch, da die Proben von Brixius eine andere Leitfähigkeit (10 mS/cm) und einen anderen pH-Wert (8,0) aufwiesen.

Nach Brixius verringert sich der Betrag des Zeta-Potentials, weil die Zellwand außen negativ und innen in der Summe neutral geladen ist. Nach dem Aufschluss bildet auch die innere Zellwand eine äußere Oberfläche und verringert entsprechend das Zeta-Potential des Zellbruchstücks gegenüber einer ganzen Zelle. Da das Zeta-Potential von der Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld abhängig ist, sollte aber neben der veränderten Größe auch der veränderte Formfaktor der Zellen be-

rücksichtigt werden. Auch die höhere Dichte des Bruchstücks gegenüber einer ganzen Zelle dürfte eine Rolle spielen. In dieser Arbeit kommt noch hinzu, dass die Leitfähigkeit der Proben geringe Unterschiede aufwiesen. Der Einfluss auf das Zeta-Potential dürfte aber unter einem halben mV liegen (vgl. Abb. 14, links, S. 38).

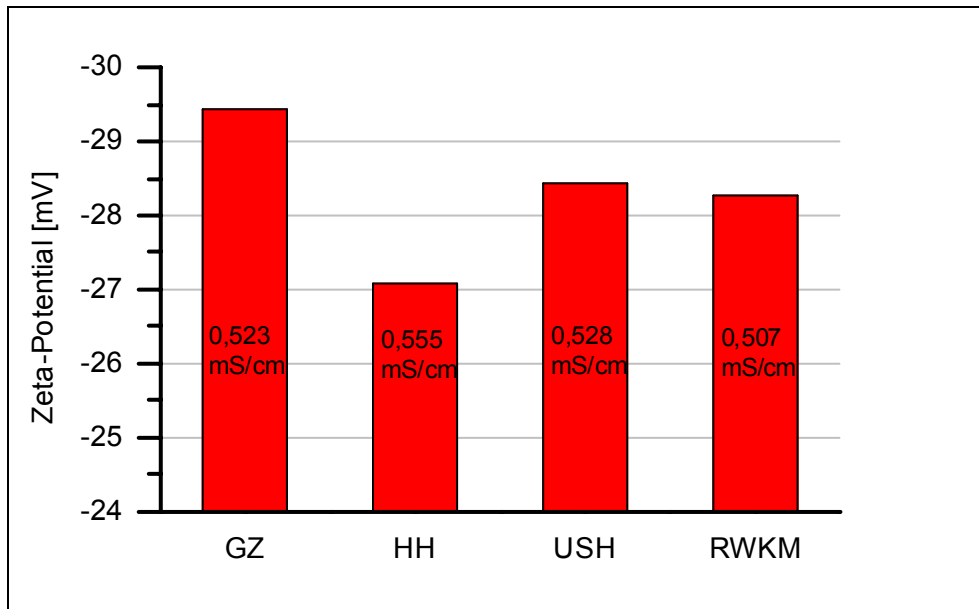


Abb. 44: Einfluss der Zellaufschlussmethode auf das Zeta-Potential, 1:100 verdünnt in 50 mM Tris/HCl pH 7,5

Die in dieser Arbeit ermittelten Werte des Zeta-Potentials korrelieren nicht mit der Annahme von Lin und Brixius, dass ein kleinerer Betrag des Zeta-Potentials zu geringeren Interaktionen und somit zu geringeren Differenzen in der Bodensteinzahl führt. Während ganze Zellen in den Verweilzeitmessungen zu den kleinsten Differenzen führten, zeigten Sie bei der Messung des Zeta-Potentials den höchsten Betrag. Bei einer Änderung des Zeta-Potentials von -29,5 mV auf -27 mV ist auch keine drastische Änderung der Oberflächeneigenschaften zu erwarten. Läge die Änderung nahe des Nullpunkts, so würde ein Unterschied von 2,5 mV deutlich mehr Einfluss haben. Der Einfluss des Zeta-Potentials auf die Bodensteinzahl ist also vernachlässigbar.

4.4.2.2 Einfluss der Partikelgeometrie auf die Agglomeration

Um zwei Adsorberpartikel zu verbinden, müssen die Zelltrümmer möglichst stark mit den Oberflächen interagieren. Dazu sind eine möglichst große Kontaktfläche sowie ein möglichst kleiner Abstand zwischen den Oberflächen notwendig. Die Oberfläche eines Adsorberpartikels ist rau (siehe Abb. 45). Die Zelltrümmer, die sich dieser rauen Oberfläche anpassen können, weisen eine stärkere Bindungskraft auf. Ganze Zellen sind verglichen mit Zelltrümmern deutlich weniger flexibel. Dies gilt insbesondere für Gram positive Zellen mit stabiler Zellwand. Da bei der Ionenaustauschchromatographie mit niedrigen Salzgehalten gearbeitet wird, stehen die Zellen aufgrund des osmotischen Drucks zusätzlich unter Spannung. Aufgrund der starren Form kann sich die Oberfläche nicht anpassen und daher nur mit den Spitzen der Rauigkeiten

Ergebnisse und Diskussion

interagieren (Abb. 46). Dies führt zu einer schwachen Bindung zwischen Zelle und Adsorber, und somit, aufgrund der verringerten Agglomerationsneigung, zu einer geringen Störung der Verweilzeitverteilung. Die Zelltrümmer aus dem Hochdruckhomogenisator (Ringe und Kappen) sind deutlich kleiner als ganze Zellen. Daher können sie tiefer in die Rauigkeiten eindringen und so besser haften als ganze Zellen. Da die Trümmer selbst aber nur eine geringe Oberfläche haben und nicht zur Agglomeration untereinander neigen, sind die Bindungskräfte und damit die Störung der Verweilzeitverteilung nur geringfügig stärker als bei ganzen Zellen.

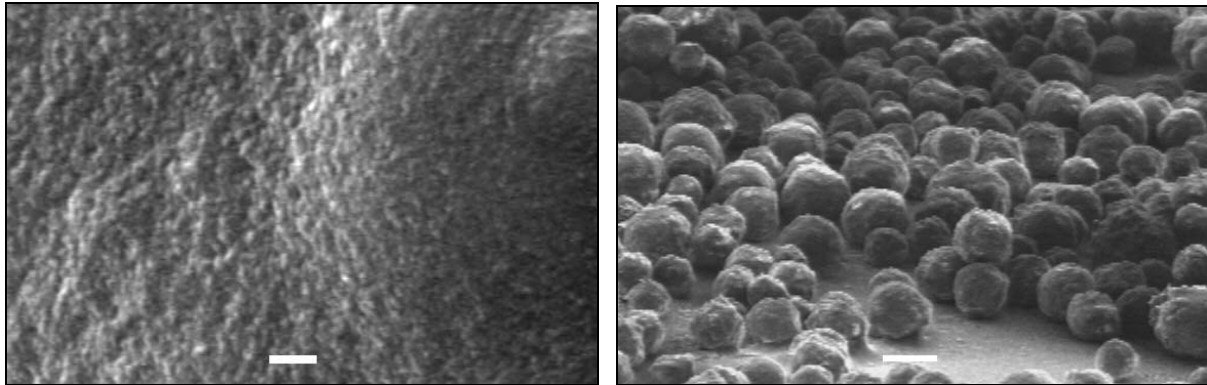


Abb. 45: links: Oberfläche eines Streamline DEAE Adsorbers; Maßstab: 1 µm, rechts: Streamline DEAE Partikel; Maßstab 100 µm

Die flexiblen leeren Zellhüllen aus dem Ultraschallhomogenisator können sich der Oberfläche anpassen und verfügen gleichzeitig über ausreichende Oberfläche, um Adsorberpartikel fest zu binden. Die Zelltrümmer nach dem Aufschluss in der Rührwerkskugelmühle haben keine definierte Struktur mehr. Die gebildeten Agglomerate können sich der Oberflächenstruktur der Adsorber sehr gut anpassen und so eine klebrige Schicht auf dem Adsorber bilden.

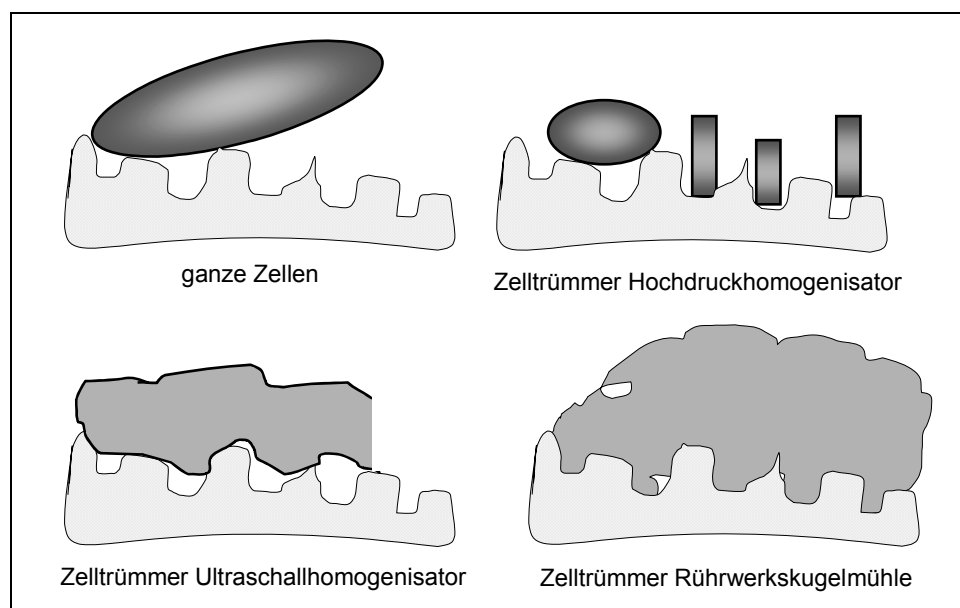


Abb. 46: Schematische Darstellung der Interaktionen zwischen Zelltrümmern und Adsorberpartikel

Aus diesem Grund geht von dieser Aufschlussmethode die größte Störung der Verweilzeitverteilung aus. Abhängig von der Partikelgrößenverteilung kann diese Interaktion sehr unterschiedlich sein. Dies erklärt auch die starken Schwankungen bei den Verweilzeitmessungen mit Zelltrümmern aus der Rührwerkskugelmühle.

Die Ergebnisse dieser Untersuchung zeigen deutlich, dass weder die Viskosität, noch die Veränderung des Zeta-Potentials für die Verringerung der Bodensteinzahl verantwortlich sind. Lediglich die Ausführungen zur unterschiedlichen Interaktionsfähigkeit der Zelltrümmer mit den Adsorberpartikeln aufgrund ihrer Größe und Flexibilität können die Ergebnisse erklären.

4.5 Abschließende Diskussion

Allgemein kann festgestellt werden, dass die Unterschiede in der Abnahme der Bodensteinzahl bei der Aufgabe verschiedener Zelltrümmer nur gering sind. Andere Einflussparameter wie eine gleichmäßige Strömungsverteilung oder der senkrechte Stand der Säule haben einen deutlich größeren Einfluss. Ferner konnte festgestellt werden, dass die Wahl der Zellaufschlussmethode großen Einfluss auf die Produktstabilität haben kann. Somit sollte die Wahl der Zellaufschlussmethode nicht nur von dem Einfluss auf die Verweilzeitverteilung gewählt werden. Besteht aber bei einem stabilen Produkt die Wahl, so ist der Hochdruckhomogenisator zu empfehlen.

Verweilzeitmessungen an Gram negativen Zellen wurden nicht durchgeführt. Jedoch ist zu vermuten, dass bei diesen Zellen die Differenzen der Bodensteinzahlen zwischen den einzelnen Zellaufschlussmethoden noch geringer sind, da die Zelltrümmer aufgrund der dünneren Zellwände deutlich flexibler und von der Form her einheitlicher sind.

5 Zusammenfassung

Bei der Aufarbeitung biotechnologischer Produkte ist zumeist eine Trennung von Zielprodukt und Produktionsstamm notwendig. Bei intrazellulären Produkten setzt dies einen Zellaufschluss voraus, der mit unterschiedlichen Geräten wie der Rührwerkskugelmühle, dem Ultraschallhomogenisator oder dem Hochdruckhomogenisator durchgeführt werden kann. Die weit verbreiteten Methoden der Zentrifugation und der Filtration zur Abtrennung der Zellen oder Zellbruchstücke vom Zielprodukt sind aufgrund der geringen Größe und des geringen Dichteunterschieds der Zelltrümmer zum umgebenden Medium problematisch. Die Technik der Expanded Bed Chromatographie kombiniert die Zelltrümmerabtrennung mit dem ersten chromatographischen Reinigungsschritt. Ein entscheidender Parameter für die Effizienz dieser Methode ist die Interaktion der Zelltrümmer mit den Adsorberpartikeln. Diese Interaktion führt zu einer Verunreinigung des Produkts mit Zelltrümmern sowie zu einer hohen Rückvermischung in der Säule. Aufgrund der daraus resultierenden unterschiedlichen Aufenthaltszeiten des Produkts in der Säule wird ein Teil des Produkts durch Strömungskanäle aus der Säule hinaustransportiert, bevor es an die Adsorberpartikel binden kann.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluss der Zellaufschlussmethode auf die Expanded Bed Chromatographie zu untersuchen. Dazu mussten zunächst die optimalen Aufschlussparameter ermittelt und es musste festgestellt werden, ob die unterschiedlichen Zellaufschlussmethoden überhaupt zu unterschiedlichen Zelltrümmern führen. Daran anschließend wurden Einflussparameter auf den Adsorptionsvorgang sowie strömungsmechanische Eigenschaften der aufgebauten Expanded Bed Anlage untersucht. Zur Klärung der Hauptfrage wurden abschließend Verweilzeitmessungen in Anwesenheit von Zelltrümmern aus verschiedenen Aufschlussgeräten vorgenommen.

Bei den Untersuchungen bezüglich des Zellaufschlusses gelang es, mit Hilfe der verschiedenen Methoden unterschiedliche Zelltrümmerformen herzustellen. Ferner konnten ein Einblick in die Mikroprozesse des Zellaufschlusses gegeben und auch die Auswirkung der verschiedenen Methoden auf die Enzymaktivität des Enzyms Dextranucrase ermittelt werden.

Die Aufnahme von Adsorptionsisothermen verschiedener Proteine an Adsorbermaterialien zeigte einen überraschend hohen Einfluss der Pufferwahl. Der Einsatz verschiedener Puffersysteme veränderte die Kapazität des Adsorbermaterials um bis zu 50%. Es konnte auch nachgewiesen werden, dass die Kapazität für jedes Protein spezifisch ist und abhängig davon ebenfalls um 50% schwanken kann. Die Versuche zur konkurrierenden Adsorption gelangen nur in Anwesenheit eines weiteren Proteins.

Zusammenfassung

Die Versuche in Anwesenheit von Zelltrümmern oder Überstand erbrachten keine reproduzierbaren Ergebnisse. Zur Klärung des Einflusses von Zelltrümmern auf die Adsorption wären weiterführende Untersuchungen notwendig gewesen, die aus zeitlichen Gründen nicht im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt werden konnten.

Zur Messung der Verweilzeitverteilungen wurden eine Expanded Bed Anlage aus einzelnen Komponenten aufgebaut und ein Programm zur Messwerterfassung, Steuerung und Regelung geschrieben. Anschließend erfolgten Messungen bezüglich des Expansionsverhaltens, der Partikelgrößenverteilung entlang der Säule und der Verweilzeitverteilung. Die gewonnenen Ergebnisse entsprachen in etwa den Literaturwerten.

Die Messung der Verweilzeitverteilung verschiedener Zelltrümmer und ganzer Zellen ergab, dass ganze Zellen die geringste Verbreiterung der Verweilzeitverteilung verursachten. Bei den Zellaufschlussgeräten schnitt der Hochdruckhomogenisator am besten ab. Mit der Rührwerkskugelmühle aufgeschlossene Zellen verursachten die größte Störung der Strömung. Als maßgeblicher Grund für diese Störung konnte die Agglomeration von Adsorberpartikeln bestimmt werden, deren Ausmaß im Wesentlichen auf den Zelltrümmergeometrien, basiert. Je flexibler die Zelltrümmer an die raue Oberfläche des Ionenaustauschers angepasst werden können, desto stärker ist die Interaktion. Ganze Zellen können aufgrund ihrer starren Form nur mit den Rauigkeitsspitzen des Adsorbers interagieren. Die Zelltrümmer aus der Rührwerkskugelmühle hingegen können aufgrund ihrer kleinen Abmessungen und dem Hang zur Agglomeration beliebige Formen annehmen und so Brücken zwischen den Adsorberpartikeln bilden. Der Einfluss der Zellaufschlussmethode auf das Zeta-Potential der Zelltrümmer war vernachlässigbar gering.

Es zeigte sich, dass die Zellaufschlussmethode einen Einfluss auf die Expanded Bed Chromatographie hat. Dieser ist jedoch bei weitem nicht so groß wie eine Störung der Strömung aufgrund einer nicht exakt senkrecht stehenden Säule oder eines teilweise verstopften Strömungsverteilers. Ferner konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Wahl des Zellaufschlussgeräts auch durch seine Auswirkungen auf das Zielprodukt eingeschränkt sein kann. Widersteht das Produkt den Auswirkungen und besteht somit eine Wahlmöglichkeit im Hinblick auf die Expanded Bed Adsorption, so ist für den Zellaufschluss der Hochdruckhomogenisator zu empfehlen.

6 Literaturverzeichnis

- Anspach, B. (1998) Gruppenselektive Sorbentien in der Feinreinigung von Proteinen. Habilitationsschrift, Technische Universität Braunschweig, Braunschweig
- Anspach, B. F.; Curbelo, D.; Hartmann, R.; Garke, G. und Deckwer, W.-D. (1999) Expanded-bed chromatography in primary protein purification. *J. Chromatogr. A* 865: 129-144.
- Becker, M. (1999) Zerkleinerung keramischer Rohstoffe und Simulation der Zerkleinerung in Rührwerkskugelmöhlen. Dissertation, Technische Universität Braunschweig, Braunschweig
- Berensmeier, S. (2004) Two Different Approaches for Enzymatic Carbohydrate Synthesis: Beta-Elimination from Polysaccharides by Pectate Lyase and Oligosaccharide Synthesis by Glucosyltransferases. Dissertation, Technische Universität Braunschweig, Buchbinderei Wolfram Schmidt, Braunschweig
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 76: 248-254.
- Brixius, P. J. (2003) On the influence of feedstock properties and composition on process development of expanded bed adsorption. Dissertation, Heinrich Heine Universität, Düsseldorf
- Brookman, J. S. G. (1974) Mechanism of Cell Disintegration in a High Pressure Homogenizer. *Biotechnol Bioeng* XVI: 371-383.
- Brooks, C. und Cramer, S. M. (1992) Steric mass-action ion exchange: displacement profiles and induced salt gradients. *AIChE Journal* 38: 1969-1978.
- Bruce, L. J. und Chase, H. A. (2001) Hydrodynamics and adsorption behaviour within an expanded bed adsorption column studied using in-bed sampling. *Chem. Eng. Sc.* 56: 3149-3162.
- Buchholz, K.; Noll-Borchers, M. und Schwengers, D. (1998) Production of Leucrose by Dextranucrase. *Starch/Stärke* 50(4): 164-172.
- Bunge, Friedhelm (1991) Mechanischer Zellaufschluss in Rührwerkskugelmöhlen. Dissertation, Technische Universität Braunschweig, VDI Verlag, Braunschweig
- Büschelberger, H. - G. (1987) Untersuchungen zum mechanischen Aufschluss von Mikroorganismen in Hochdruckhomogenisatoren. Technische Hochschule Friedericiana Karlsruhe, Schnelldruck Ernst Grässer, Karlsruhe
- Chang, Y. K. und Chase, H. A. (1996) Ion Exchange Purification of G6PDH from Unclearified Yeast Cell Homogenates Using Expanded Bed Adsorption. *Biotechnology and Bioengineering* 49: 204-216.
- Chase, H. A. (1994) Purification of proteins by adsorption chromatography in expanded beds. *Trends Biotechnol.* 12(8): 296-303.

Literaturverzeichnis

- Chen, W.-D.; Dong, X.-Y. und Sun, Y. (2003) Modeling of the whole expanded-bed protein adsorption process with yeast cell suspensions as feedstock. *J. Chromatogr. A* 1012: 1-10.
- Choi, H. B.; Hwang, K. Y. und Shin, E. B. (1997) Effects on anaerobic digestion of sewage sludge pretreatment. *Wat. Sci. Tech.* 10(35): 207-211.
- Daune, M (1997) Molekulare Biophysik, Friedr. Vieweg und Sohn Verlagsgesellschaft mbH, Braunschweig/Wiesbaden
- Doulah, M. S. (1977) Mechanism of disintegration of biological cells in ultrasonic cavitation. *Biotechnol. Bioeng.* 19(5): 649-60.
- Edebo, L. (1969) Disintegration of cells. International Fermentation Symposium Conf. Proc. 249-271.
- Fenneteau, F.; Aomari, H.; Chahal, P. und Legros, R. (2003) Modeling of scale-down effects on the hydrodynamics of expanded bed adsorption columns. *Biotechnol. Bioeng.* 81(7): 790-9.
- Fernandez-Lahore, H. M.; Geilenkirchen, S.; Boldt, K.; Nagel, A.; Kula, M.-R. und Thömmes, J. (2000) The influence of cell adsorbent interactions on protein adsorption in expanded beds. *J. Chromatogr. A* 873: 195-208.
- Fernandez-Lahore, H. M.; Kleef, R.; Kula, M. und Thömmes, J. (1999) The influence of complex biological feedstock on the fluidization and bed stability in expanded bed adsorption. *Biotechnol. Bioeng.* 64(4): 484-96.
- Fernandez-Lahore, H. M.; Lin, D.-Q.; Hubbuch, J. J. und Kula, M.-R. (2001) The Use of Ion-Selective Electrodes for Evaluating Residence Time Distributions in Expanded Bed Adsorption Systems. *Biotechnol. Prog.* 17: 1128-36.
- Feuser, J.; Walter, J.; Kula, M. R. und Thommes, J. (1999) Cell/adsorbent interactions in expanded bed adsorption of proteins. *Bioseparation* 8(1-5): 99-109.
- Fritz, W. und Schlünder, E. U. (1974) *Chem. Eng. Sci.* 29: 1279.
- Garke, G. (2000) Mathematische Simulation chromatographischer Prozesse am Beispiel der Aufarbeitung von rh-bFGF aus der E. coli Hochzelldichtekultivierung sowie von Modellproteinen. *Fortschritt-Berichte VDI* 17(199).
- GE Healthcare (2004) Effect of STREAMLINE Direct column inlet design on CHO and hybridoma cell membrane integrity.
- Götze, S. (2003) Expression, Reinigung und Charakterisierung rekombinanter Dextranucrase. Diplomarbeit, Technische Universität Braunschweig, Braunschweig
- Ham, Jong-Ho und Platzner, Bernd (2004) Halbempirische Gleichungen für die Verweilzeitverteilungen in dispersen Systemen - Teil 1: Fluide Phase. *Chem. Ing. Tech.* 76(1-2): 132-138.
- Herrmann, T. (2003) Proteinadsorption: Isothermen und Struktur. Diplomarbeit, Technische Universität Braunschweig, Braunschweig

Literaturverzeichnis

- Hetherington, P. J.; Follows, M.; Dunnill, P. und Lilly, M. D. (1971) Release of Protein from baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) by disruption in an industrial homogenizer. *Trans I Chem E* 49: 142-148.
- Hjorth, R.; Leijon, P.; Barnfield, A.-K. und Jägersten, C. (1998) Expanded Bed Adsorption Chromatographie. Bioreseparation and Bioprocessing: A Handbook; Band 1. Subramanian, G., Weinheim, Wiley-VCH. 1: 199-226.
- Hollmann, R. und Deckwer, W.-D. (2004) Pyruvate formation and suppression in recombinant *Bacillus megaterium* cultivation. *J. Biotechnol.* 111: 89-96.
- Höltje, J.-V. (1998) Growth of stress-bearing and shape maintaining murein sacculus of *Escherichia coli*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62: 181-203.
- Hubbich, J. J.; Heeboll-Nielsen, A.; Hobley, T. J. und Thomas, O. R. (2002) A new fluid distribution system for scale-flexible expanded bed adsorption. *Biotechnol. Bioeng.* 78(1): 35-43.
- Hughes, D. E.; Wimpenny, J.W.T. und Lloyd, D. (1971) The disintegration of microorganisms. *Methods in Microbiology* 5: 2-53.
- Hull, A. S. und Middelberg, A. P. (1993) Evidence that septated *E. coli* disrupt preferentially during high-pressure homogenization. *Trans I Chem E* 71(C): 264-266.
- Jahnke, S. (1998) Desintegration mit Hochdruckhomogenisatoren. Klärschlamm-Desintegration. Müller, J., Dichtl, N. und Schwedes, J., Braunschweig, Schmidt Buchbinderei & Druckerei: 31-48.
- Jakubith, M. (1991) Chemische Verfahrenstechnik, VCH Weinheim, Weinheim
- Kaczmarek, K. und Bellot, J.-C. (2004) Theoretical Investigation of Axial and Local Particle Size Distribution on Expanded Bed Adsorption Process. *Biotechnol. Prog.* 20: 786-792.
- Kampen, I.; Nolte, A. und Schwedes, J. (2004) Auswirkungen der Zellaufschlussmethode auf die Zelltrümmer von *Bacillus megaterium*. *Chem. Ing. Tech.* 76(4): 482-484.
- Kiefer, P. (1977) Der Einfluss von Scherkräften auf die Tröpfchenzerkleinerung beim Homogenisieren von Öl-in-Wasser-Emulsionen in Hochdruckhomogenisierdüsen. Dissertation, Technische Hochschule Fridericiana Karlsruhe, Karlsruhe
- Kleinig, A. R.; O'Neill, B. K. und Middelberg, A. P. (1996) The effect of homogeniser impact distance on the disruption of *Escherichia coli*. *Biotechnology Techniques* 10(3): 199-204.
- Kramer, H. (1987) Experimente zur Erfassung der Scherbeanspruchung von Hybridomazellen. Rheologie und mechanische Beanspruchung biologischer Systeme, Düsseldorf, GVC - VDI-Gesellschaft Verfahrenstechnik: 175-187.
- Kula, M. und Schütte, H. (1987) Purification of Proteins and the Disruption of Microbial Cells. *Biotechnol. Prog.* 3(1): 31-42.

Literaturverzeichnis

- Kurzthals, H.-A. (1977) Untersuchungen über die physikalisch-technischen Vorgänge beim Homogenisieren von Milch in Hochdruck-Homogenisiermaschinen. Dissertation, Technische Universität Hannover, Bönecke-Druck, Clausthal, Hannover
- Kwade, A. (1996) Autogenzerkleinerung von Kalkstein in Rührwerkmühlen. Dissertation, Technische Universität Braunschweig, Braunschweig
- Lehne, G. (2001) Parameter der mechanischen Desintegration von Überschußschlämmen. Dissertation, Technische Universität Braunschweig, Cuvillier Verlag Göttingen, Braunschweig
- Levenspiel, O. (1999) Chemical Reaction Engineering, John Wiley & Sons, New York
- Lin, D.-Q.; Brixus, P. J.; Hubbuch, J. J.; Thömmes, J. und Kula, M.-R. (2003a) Biomass/Adsorbent Electrostatic Interactions in Expanded Bed Adsorption: A Zeta Potential Study. *Biotechnol. Bioeng.* 83(2): 149-157.
- Lin, D.-Q.; Kula, M.-R.; Liten, A. und Thömmes, J. (2003b) Stability of Expanded Beds during the Application of Crude Feedstock. *Biotechnol. Bioeng.* 81(1): 21-26.
- Malten, M. (2002) Produktion und Sekretion einer Dextranucrase in *Bacillus megaterium*. Diplomarbeit, Technische Universität Braunschweig, Braunschweig
- Marczinczik, V. (APV Deutschland GmbH), Ed. (2004) Zellaufschluss. Downstream Processing Seminar. Weißenstephan, BayTech.
- Mashmouhy, H.; Zhang, Z. und Thomas, C. R. (1998) Micromanipulation measurement of the mechanical properties of baker's yeast cells. *Biotechnol. Tech.* 12(12): 925-929.
- Mende, S. (2004) Mechanische Erzeugung von Nanopartikeln in Rührwerkskugelmühlen. Dissertation, TU Braunschweig, Braunschweig
- Middelberg, A. P. (1993) Extension of the wall-strength model for high-pressure homogenisation to multiple passes. *Trans I Chem E* 71(C): 215-219.
- Middelberg, A. P. (1998) The Release of Intracellular Bioproducts. Bioseparation and Bioprocessing, Band 2. Subramanian, G., Weinheim, Wiley-VCH. 2: 132-164.
- Middelberg, A. P. und O'Neill, B. K. (1993) A Correlation for the Effective Strength of *Escherichia coli* during Homogenization. *Biotechnol. Prog.* 9: 109-112.
- Milner, H.W.; Lawrence, N.S. und French, C. S. (1950) Colloidal dispersion of chloroplast material. *Science* 6: 633-634.
- Müller, J. (1996a) Mechanischer Klärschlammaufschluß. Dissertation, Technische Universität Braunschweig, Shaker Verlag, Aachen, Braunschweig
- Müller, R. H. (1996b) Zetapotential und Partikelladung in der Laborpraxis, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart
- Mullick, A. und Flickinger, M. C. (1999) Expanded bed adsorption of human serum albumin from very dense *Saccharomyces cerevisiae* suspensions on fluoride-modified zirconia. *Biotechnol. Bioeng.* 65(3): 282-90.
- Myers, A. L. (1983) Activity coefficients of mixtures adsorbed on heterogeneous surfaces. *AIChE J.* 29(4): 691-693.

Literaturverzeichnis

- Myers, A. L. und Prausnitz, J. M. (1965) Thermodynamics of mixed-gas adsorption. *AIChE J.* 11(1): 121-127.
- Neis, U. und Thiem, A. (1999) Ultrasound in wastewater and sludge treatment. Ultrasound in environmental engineering. Neis, U. und Thiem, A., Hamburg, GFEU. **1**: 39-61.
- Nickel, K.; Thiem, A. und Neis, U. (1998) Pilotversuche zur Beschleunigung des anaeroben Abbaus von Klärschlamm durch Ultraschall. Klärschlammdeintegration. Müller, J., Dichtl, N. und Schwedes, J., Braunschweig, Schmidt Buchbinderei & Druckerei: 97-111.
- Nicoud, R. M. und Seidel-Morgenstern, A. (1996) Adsorption Isotherms: Experimental Determination and Application to Preparative Chromatography. *Isolation & Purification* 2: 165-200.
- Nolte, A. (2005) Charakterisierung des Verweilzeitverhaltens von Zelltrümmern im Expanded-Bed. Diplomarbeit, Technische Universität Braunschweig, Braunschweig
- Pai, A.; Gondkar, S.; Sundaram, S. und Lali, A. (1999) Expanded bed adsorption on supermacroporous cross-linked cellulose matrix. *Bioseparation* 8(1-5): 131-8.
- Palsson, E.; Axelsson, A. und Larsson, P. O. (2001) Theories of chromatographic efficiency applied to expanded beds. *J. Chromatogr. A* 912(2): 235-48.
- Peterson, D. L. und Redlich, O. (1962) Sorption of Normal Paraffins by Molecular Sieves Type 5A. *J. Chem. Eng. Data* 7: 570.
- Pittroff, Martin (1993) Mechanischer Zellaufschluss von Mikroorganismen im Apparatvergleich zwischen Rührwerkskugelmühle und Hochdruckhomogenisator. Dissertation, Universität Fridericiana Karlsruhe, Karlsruhe
- Portenlänger, G. (1999) Mechanical and radical effects of ultrasound. Ultrasound in environmental engineering. Neis, U. und Thiem, A., Hamburg, GFEU. **1**: 11-22.
- Posten, C. (2002) Biological Aspects in Solid Liquid Separation. IFPRI Bericht, Karlsruhe
- Radke, C. J. und Prausnitz, J. M. (1972) Thermodynamics of multi-solute adsorption from dilute liquid solutions. *AIChE J.* 18(4): 761-768.
- Reershemius, H. K. (2004) Proteinaufreinigung im Expanded Bed. Diplomarbeit, Technische Universität Braunschweig, Braunschweig
- Retsch (2004) Zerkleinern und Homogenisieren mit Kugelmøhlen. Firmenprospekt,
- Richardson, J. F. und Zaki, W. N. (1997) Sedimentation and Fluidisation: Part 1. *Trans IChemE* 75: S82.
- Rumpf, H. (1965) Die Einzelkornbeanspruchung als Grundlage einer technischen Zerkleinerungswissenschaft. *Chem. Ing. Tech.* 37: 187-202.
- Schlegel, G. G. (1985) Allgemeine Mikrobiologie, Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- Schwedes, J. und Bunge, F. (1990) Mechanische Zellaufschlussverfahren. Jahrbuch Biotechnologie, Carl Hanser Verlag. **3**: 195 - 218.

-
- Seidel-Morgenstern, A. (1995) Mathematische Modellierung der präparativen Flüssigchromatographie, Deutscher Universitätsverlag, Wiesbaden
- Shah, Y.T.; Pandit, A.B. und Moholkar, V.S. (1999) Cavitation Reaction Engineering, Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York
- Shiu, C.; Zhang, Z. und Thomas, C. R. (1999) A novel technique for the study of bacterial cell mechanical properties. *Biotechnol. Tech.* 13: 707-713.
- Smith, A. E.; Zhang, Z. und Thomas, C. R. (2000) Wall material properties of yeast cells: Part 1. Cell measurements and compression experiments. *Chem. Eng. Sc.* 55: 2031-2041.
- Srinorakutara, T. (1998) Determination of Yeast Cell Wall Thickness and Cell Diameter Using New Methods. *J. Ferm. Bioeng.* 86(3): 253-260.
- Stehr, N. (1982) Zerkleinerung und Materialtransport in einer Rührwerkskugelmühle. Dissertation, Braunschweig
- Stender, Hans-Henning (2002) Einfluss der Größe und Bauart auf die Zerkleinerung in Rührwerkskugelmühlen. Dissertation, Technische Universität Braunschweig, Cuvillier Verlag Göttingen, Braunschweig
- Theodossiou, I.; Elsner, H. D.; Thomas, O. R. und Hobley, T. J. (2002) Fluidisation and dispersion behaviour of small high density pellicular expanded bed adsorbents. *J Chromatogr A* 964(1-2): 77-89.
- Thomas, C. R.; Zhang, Z. und Cowen, C. (2000) Micromanipulation measurements of biological material. *Biotechnology Letters* 22: 531-537.
- Thömmes, J. (1997) Fluidized Bed Adsorption as a Primary Recovery Step in Protein Purification. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 58: 185-230.
- Tong, X. D.; Dong, X.-Y. und Sun, Y. (2002) Lysozyme adsorption and purification by expanded bed chromatography with a small-sized dense adsorbent. *Biochem. Eng. J.* 12: 117-124.
- Tong, X. D. und Sun, Y. (2002a) Nd-Fe-B alloy-densified agarose gel for expanded bed adsorption of proteins. *J. Chromatogr. A* 943(1): 63-75.
- Tong, X. D. und Sun, Y. (2002b) Particle size and density distributions of two dense matrices in an expanded bed system. *J. Chromatogr. A* 977(2): 173-83.
- Tong, X.-D.; Xue, B. und Sun, Y. (2003) Modeling of expanded-bed protein adsorption by taking into account the axial particle size distribution. *Biochem. Eng. J.* 16: 265-272.
- Tonnus, F. G. (1982) Verfahren zum Herstellen von Nucleinsäurearmen Proteinkonzentraten aus Bäckerhefe. Dissertation, Technische Hochschule Fridericiana Karlsruhe, Karlsruhe
- Valenzuela, D. P.; Myers, A. L.; Talu, O. und Zwiebel, I. (1988) Adsorption of gas mixtures: Effect of energetic heterogeneity. *AIChE J.* 34(3): 397-402.

Literaturverzeichnis

- Van Loo, J.; Cummings, J.; Delzenne, N.; Englyst, H.; Franck, A.; Hopkins, M.; Kok, N.; Macfarlane, G.; Newton, D.; Quigley, M.; Roberfroid, M.; van Vliet, T. und van den Heuvel, E. (1999) Functional food properties of non-digestible oligosaccharides: a consensus report from the ENDO project (DGXII AIRII-CT94-1095). *Br. J. Nutr.* 81(2): 121-32.
- Wang, C. X.; Wang, L. und Thomas, C. R. (2004) Modelling the Mechanical Properties of Single Suspension-Cultured Tomato Cells. *Annals of Botany* 93: 443-453.
- Weit, H. (1987) Betriebsverhalten und Maßstabsvergrößerung von Rührwerkskugelmühlen. Dissertation, TU Braunschweig, Braunschweig
- Willoughby, N. A.; Hjorth, R. und Titchener-Hooker, N. J. (2000) Experimental measurement of particle size distribution and voidage in an expanded bed adsorption system. *Biotechnol. Bioeng.* 69(6): 648-53.
- Zhou, L. und Zhang, J. (2001) A Simple Isotherm Equation for Modeling the Adsorption Equilibria on Porous Solids over Wide Temperature Ranges. *Langmuir* 17: 5503-07.
- Zhu, B. Y. und Gu, T. (1989) *Chem. Soc., Faraday Trans.* 85: 3813.

7 Anhang

Tab. 12: Liste der Einzelteile in der Expanded Bed Anlage

Gerät	Hersteller	Beschreibung
Vorratsbehälter 10 Liter	Schott	
2x Waagen Modell 470 mit RS232 Schnittstelle	Kern	
Zahnradpumpe Reglo Z	Ismatec	
2x Schlauchpumpen 505U/RL	Watson/ Marlow	
5x 3/2-Wege-Magnetventile Typ 124	Bürkert	
Messzelle oben und unten	IMVT	PP-Block mit Bohrungen und Gewinden
Blasenfalle	Schmidt-Laborbedarf	Nach eigener Zeichnung gefertigt
Einschraub-Widerstandsthermometer (PT-100) MRW-53040-40-4000-0	Therma Thermofühler GmbH	
2x Druckmessumformer 4341-242-076	Jumo	
2x pH-Messgeräte pH 340i	WTW	
Leitfähigkeitsmessgerät LF 530	WTW	
UV-Durchflussspektrometer Modell BT 8200	Jasco	Die Durchflusszelle war eine Eigenkonstruktion
Fluoreszenzmessgerät F-1050	Merck/Hitachi	Variable Ein- und Ausgangswellenlänge
Fraktionssammler M206	Gilson	27 Fraktionen in 250 ml Flaschen
Säule Streamline 25 mm	Amersham-Biosciences	
Säule 50 mm Durchmesser	IMVT	Präzisionsglasrohr mit zehn Bohrungen von QVF
Signalkonditionierungsanlage Fieldpoint bestehend aus: Netzwerkmodul FP-1600 Analogeingangsmodule FP-A1-110 Analogausgangsmodule FPAO-200 2x 8-Kanal-Relais FP-RLY	National Instruments	Das Analogeingangsmodule nahm die Messwerte für die Temperatur, Druck, pH-Wert, UV-Adsorption und Fluoreszenz auf. Das Analogausgangsmodule steuerte die Pumpen und die Relais die Ventile.
Computer	N.N.	zus. serielle Schnittstellenkarte

Anhang

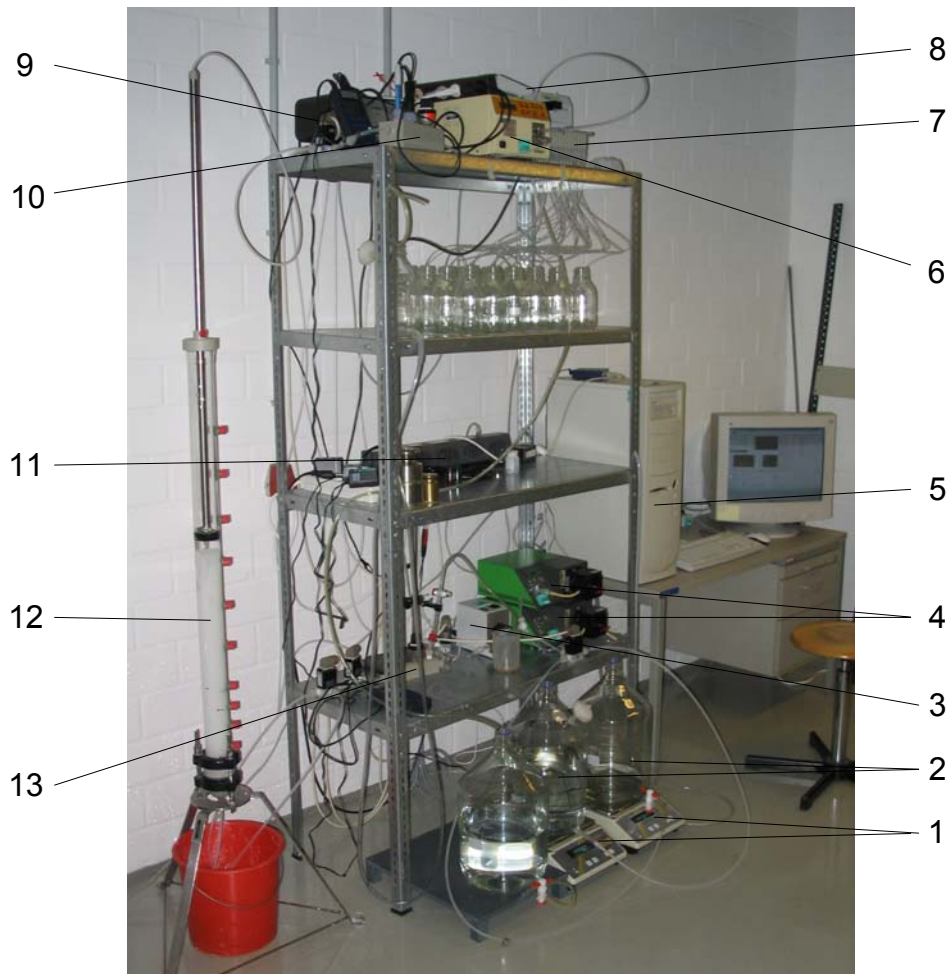


Abb. 47: Foto der Expanded Bed Anlage

- 1: Waagen**
- 2: Vorratsflaschen**
- 3: Zahnradpumpe**
- 4: Schlauchpumpen**
- 5: Computer zur Steuerung und Regelung der Anlage**
- 6: UV-Detektor**
- 7: Fraktionssammler**
- 8: Fluoreszenzdetektor**
- 9: Leitfähigkeitsmessgerät**
- 10: obere Messzelle**
- 11: Signalkonditionierungsanlage**
- 12: Expanded Bed Säule (5 cm Durchmesser)**
- 13: untere Messzelle**

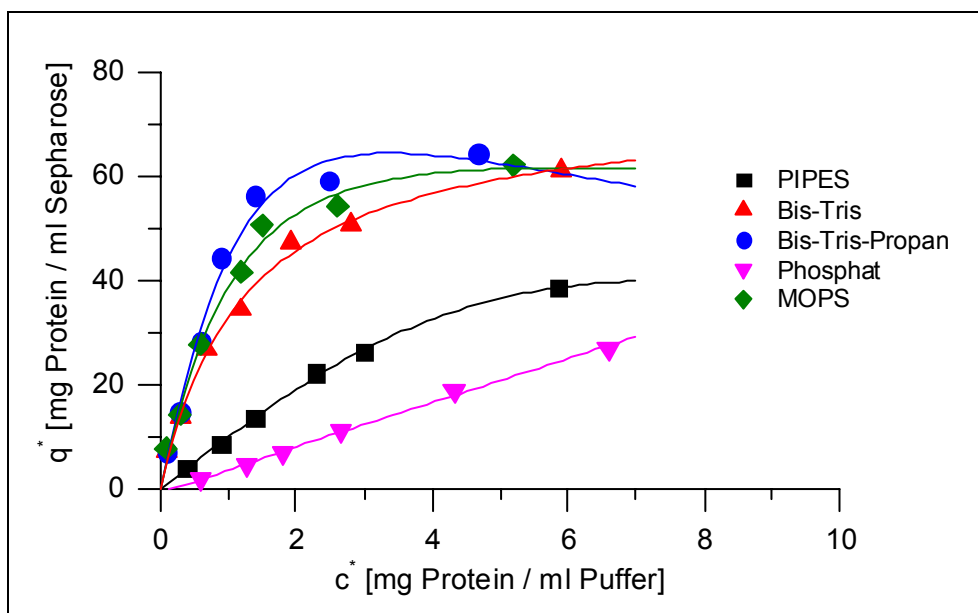


Abb. 48: Adsorptionsisothermen in unterschiedlichen Puffern bei pH 7, Protein: CAT (MW = 220 kD; pI = 5,4); Adsorptionsisotherme nach Redlich-Peterson (Gleichung 36) angepasst, Adsorber: DEAE-Sepharose

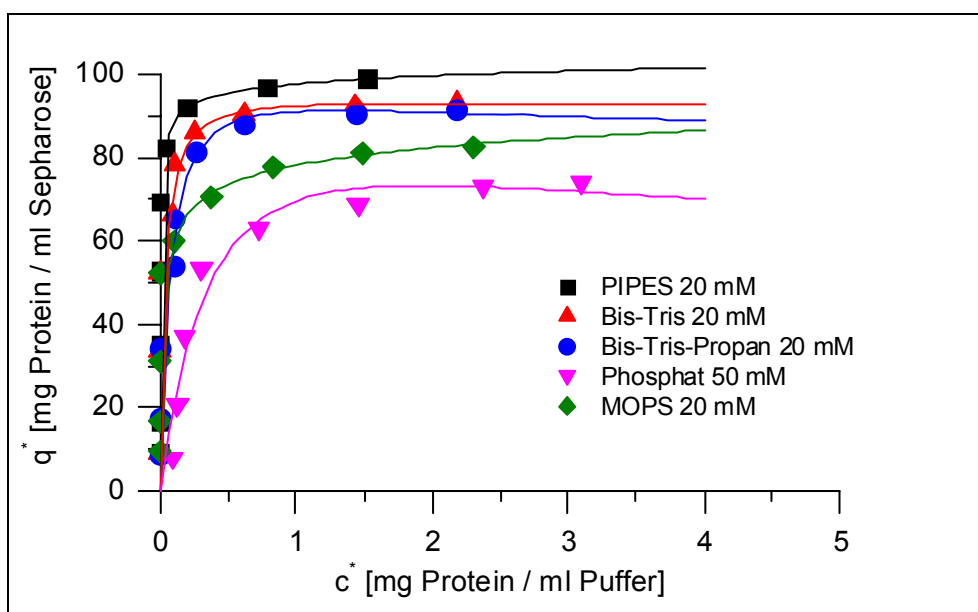


Abb. 49: Adsorptionsisothermen in unterschiedlichen Puffern bei pH 7, Protein: LYS (MW = 220 kD; pI = 5,4); Adsorptionsisotherme nach Redlich-Peterson (Gleichung 36) angepasst, Adsorber: SP-Sepharose

Anhang

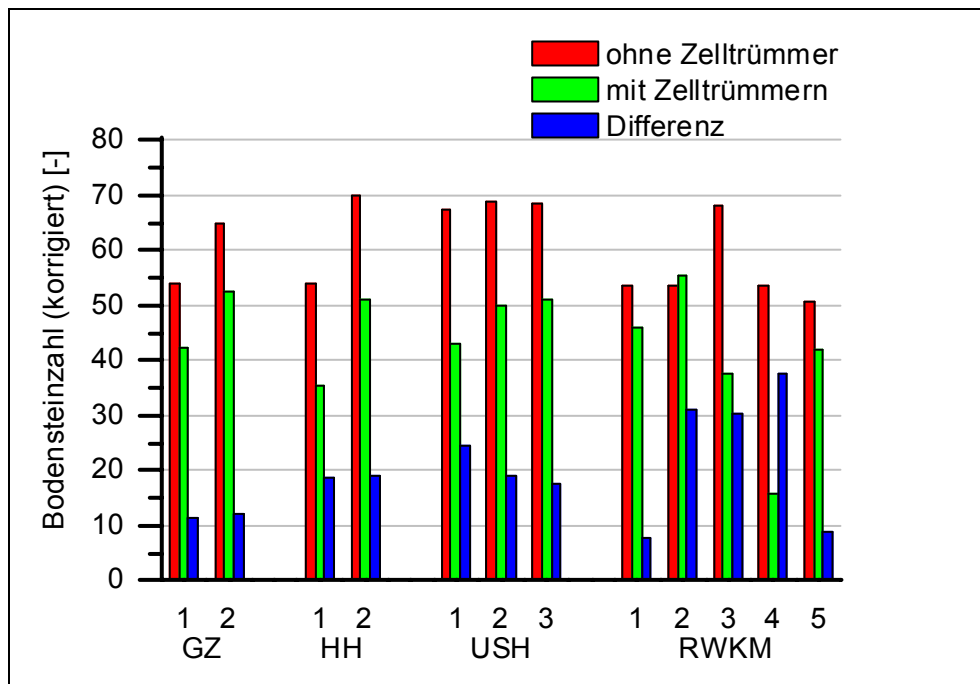


Abb. 50: Einzelauflistung der gemessenen Bodensteinzahlen nach Korrektur (aufgrund schiefer Grundlinie). GZ: Ganze Zellen; HH: Hochdruck-homogenisator; USH: Ultraschallhomogenisator; RWKM: Rührwerks-kugelmühle

Lebenslauf

Name	Ingo Kampen	
Geburtsdatum/Ort	03.03.1972 in Hildesheim	
Nationalität	Deutsch	
Familienstand	geschieden	
Kinder	Tochter Cassandra *13.10.1998	
Schulbildung	07/78 - 06/82	Grundschule Greifswalder Straße, Hildesheim
	07/82 - 07/84	Orientierungsstufe OST, Hildesheim
	08/84 - 05/92	Goethegymnasium Hildesheim
	05/92	Abitur
Ausbildung	08/92 - 07/94	Chemie- und Pharmazieschule Hannover
Abschluss	07/94	Chemisch-Technischer Assistent
Zivildienst	07/94 - 09/95	Altenheim Bethanien (Braunschweig)
Studium	10/95 - 08/01	Technische Universität Braunschweig, Studiengang Biotechnologie
Studienabschluss	08/01	Diplom Biotechnologe
Wissenschaftlicher Mitarbeiter	seit 11/01	Institut für Mechanische Verfahrenstechnik der Technischen Universität Braunschweig (Dieses Institut trägt seit 09/05 den Namen: Institut für Partikeltechnik)